

531,769  
19 APR 2005

Rec'd PCT/PTO

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С  
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
Международное бюро



PCT



(43) Дата международной публикации:  
6 мая 2004 (06.05.2004)

(10) Номер международной публикации:  
WO 2004/038023 A1

(51) Международная патентная классификация<sup>7</sup>:  
C12N 15/29, 15/52, 15/82, A01H 1/06

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2003/000439

(22) Дата международной подачи:  
15 октября 2003 (15.10.2003)

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

(30) Данные о приоритете:  
2002128414 24 октября 2002 (24.10.2002) RU

(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме  
(US): ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИ-  
МИИ им. М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИН-  
НИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
[RU/RU]; 117871 Москва, В-437, ул. Миклухо-  
Маклая, д. 16/10 (RU) [SHEMYAKIN AND  
OVCHINNIKOV INSTITUTE OF BIOORGANIC  
CHEMISTRY RUSSIAN ACADEMY OF SCIEN-  
CES, Moscow (RU)].

142290 Московская обл., Пушкино, м-р «АБ», д.  
23, кв. 121 (RU) [SHESTIBRATOV, Konstantin  
Aleksandrovich, Puschino (RU)]; ДОЛГОВ  
Сергей Владимирович [RU/RU]; 142290  
Московская обл., Пушкино, м-р «Д», д. 1, кв. 138  
(RU) [DOLGOV, Sergey Vladimirovich, Puschino  
(RU)].

(81) Указанные государства (национально): AU, CA,  
MX, US.

(84) Указанные государства (регионально): европей-  
ский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE, SI, SK, TR).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

Касающаяся права испрашивать приоритет  
предшествующей заявки (правило 4.17 (iii)) для  
всех указанных государств

Опубликована

С отчётом о международном поиске.

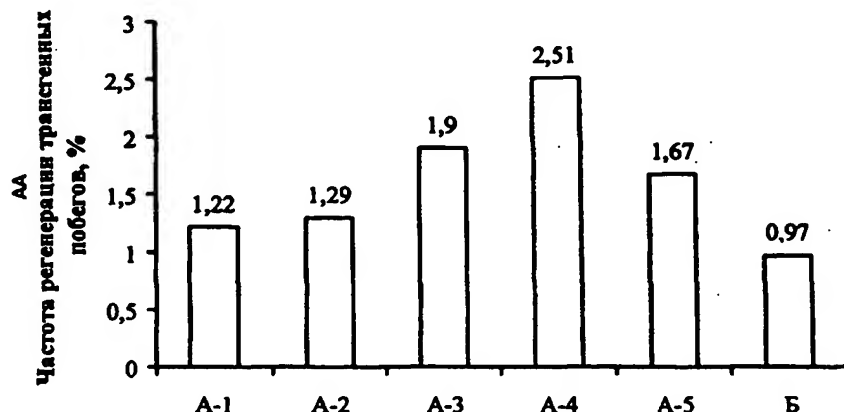
В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и дру-  
гих сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям»,  
публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюл-  
летеня РСТ.

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для (US): ШЕСТИ-  
БРАТОВ Константин Александрович [RU/RU];

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING A TRANSGENIC PLANT WITH THE AID OF AGROBACTERIUM  
TUMEFACIENS

(54) Название изобретения: СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННОГО РАСТЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ  
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS



AA...FREQUENCY OF REGENERATION OF TRANSGENIC SCIONS.

(57) Abstract: The invention relates to an improved method for agrobacterium transformation and regeneration of plants. The inventive method is characterised in that it consists in sequentially preparing, inoculating and co-cultivating explants. The preparation of each subsequent lot of plants is carried out after a time interval for transforming plant cells and forming an induced resistance with respect to abiotic and biotic stresses in a leaf discs, thereby making it possible to reduce a necrosis degree and the number of somaclonal variations of the transgenic plants.

[Продолжение на след. странице]

WO 2004/038023 A1



---

(57) Реферат: Приводится усовершенствованный метод агробактериальной трансформации и регенерации трансгенных растений. Сущность метода состоит в том, что способ включает в себя постадийную подготовку, инокуляцию и кокультивацию эксплантов. Подготовка каждой из последующих партий эксплантов выполняется после временного интервала необходимого для трансформации растительных клеток и формирования в листовых дисках индуцируемой резистентности к абиотическим и биотическим стрессам. Это позволяет снизить степень некроза и количество соматоклональных изменений у трансгенных растений.

## Способ получения трансгенного растения с помощью *Agrobacterium tumefaciens*

### Область техники

Изобретение относится к области генетической инженерии растений и может  
5 быть использовано для создания трансгенных растений с заданными свойствами.

### Предшествующий уровень техники

Основной ущерб сельскохозяйственным культурам причиняется вирусными, бактериальными и грибными патогенами, причем наносимый вред существенно  
10 превышает таковой от насекомых и других вредителей вместе взятых. В свою очередь, грибы патогены по вредоносности занимают первое место среди прочих возбудителей заболеваний.

Например, эффективное возделывание земляники ограничивается несколькими болезнями: фитофторозное увядание (*Phytophthora fragariae*),  
15 вертициллярное увядание (*Verticillium alboatrum*), пятнистость листьев (*Mycosphaerella fragariae*), листовой ожог (*Diplocarpon earliana*), скручивание листовых пластинок (*Dendrophoma obscurans*), серая гниль (*Botrytis cinerea*), мучнистая роса (*Sphaerotheca humuli*) и др. Грибы возбудители заболеваний растений, не только влияют на рост и развитие растительного организма, но  
20 зачастую значительно снижают продуктивность культурных насаждений.

В современном сельском хозяйстве эффективный контроль над грибными патогенами достигается комплексным подходом. С одной стороны, методами традиционной селекции выводятся новые сорта, обладающие повышенной устойчивостью к определенным расам грибов. Однако на получение одного сорта  
25 таким способом уходит в среднем около 10 лет. За это время патогенны зачастую успевают мутировать и новый сорт теряет резистентность и быстро устаревает. Альтернативный подход – генетическая инженерия. Способ генетической трансформации растений позволяет переносить в них отдельные гены резистентности и получать растения с повышенной устойчивостью к широкому  
30 спектру фитопатогенов за короткое время.

Получение трансгенных растений с повышенной устойчивостью обычно сталкивается с проблемами воспроизводимости известных способов и с проблемами получения растений с низким уровнем соматических отклонений.

Известны публикации, посвященные оптимизации способа генетической трансформации земляники садовой разработанной James et al. (1990) и Nehra et al. (1990). В способе трансформации изменяли: 1) состав минеральной и/или гормональной среды для регенерации и селекции трансформантов, 2) тип и концентрацию селективного агента, 3) генотип сорта, 4) тип штамма и векторную конструкцию, 5) тип и концентрацию углеводов, 6) тип экспланта (листья, черешки, сегменты усов, меристема).

Du Plessis et al. (1997) изменили способ агробактериальной трансформации заменив в среде селекции и регенерации трансформантов 6-бензиламинопурин на синтетический регулятор роста – тидиазурон. Он оказался более эффективным регулятором роста для земляники. Вместо агробактериального штамма LBA4404 авторы стали использовать C58/PGV2260. Разработанный способ обладает существенным недостатком – очень высокой частотой соматических изменений среди трансформантов.

Dier et al. (2001) показали, что смена сахарозы на глюкозу, в средах мультипликации, кокультивации, селекции и регенерации трансформантов, значительно повышает частоту регенерации трансгенных побегов. Известно решение, в котором авторы делают попытки снизить частоту соматических изменений путем замены сахарозы на мальтозу (Stuart et al. US Patent 4,801,545, 1989).

Mathews et al. (1998) показали, что концентрация и тип селективного агента в культуральной среде оказывают большое влияние на процесс регенерации трансгенных побегов. Также имеет значение и продолжительность культивирования на селективной среде. Изменение системы селекции позволило получать чистые, нехимерные линии, состоящие только из трансгенных клеток.

Dolgov et al. (1999), используя способ описанный в работах James et al. (1990) и Nehra et al. (1990) разработанный для сорта Redcoat, получили трансгенное растение земляники садовой сорта Фейерверк. Эффективность метода трансформации для сорта Фейерверк оказалась менее 1%, в то время как для сорта Redcoat эффективность разработанного метода составляла 6,5%.

De Mesa et al. (2000) изменили способ генетической трансформации, скомбинировав способ, разработанный James et al. (1990) и Nehra et al. (1990), с баллистическим методом. Механические повреждения на листовых дисках они наносили микрочастицами.

В перечисленных способах подготовка эксплантов основана на единовременной процедуре подготовки всего числа эксплантов (James et al. 1990 и Nehra et al. 1990). Известен способ, при котором в качестве эксплантов используют целые листовые пластинки, на которые одновременно наносится максимальное количество механических повреждений (Trinh et al. 2001). Оба эти способа повышают частоту некроза.

Numaga et al. (1999) показали, что нанесение микротравм ультразвуком на нежную ткань семядольных эксплантах сосны сопровождается более низкой частотой некроза. Способ применим только для эмбриональных тканей зародышей или любых других случаев, когда регенерация идет из эпителиальных клеток.

Известны публикации, в которых способ генетической трансформации оптимизируют для предотвращения некротических реакций при подготовке растительных эксплантов и инокуляции их в агробактериальной суспензии.

Perl et al. (1996) пытались снизить частоту некроза за счет использования антиоксидантов. Добавление в среду кокультивации одновременно таких компонентов как DTT и PVPP позволило полностью ингибировать некроз, и добиться получения фертильных трансгенных растений винограда. Однако, способ воспроизводим только на растительном материале одного сорта Superior Seedless.

Olhoft et al. (2001) обнаружили, что соединения с тиоловыми группами, например L-цистеин, способны повышать частоту трансформации агробактериями клеток *Glycine max*. Эффект проявляется только на стадии кокультивации эксплантов с агробактериями. Авторы обнаружили также, что не только L-цистеин при добавлении в среду кокультивации может позитивно влиять на процесс трансформации. Аналогичную активность проявляли такие вещества как глутатион, DTT, натрия тиосульфат, ионы меди и хелаты железа. Перечисленные вещества ингибируют активность растительных полифенолоксидаз и пероксидаз, подавляя тем самым развитие некротических реакций вызванных поранением или патогенами.

Однако, все перечисленные химические компоненты, добавляемые в питательную среду, не только влияют на процесс взаимодействия бактерий с растительными клетками, но и оказывают негативное влияние на саму растительную ткань эксплантов.

Известен комбинированный подход для устранения некроза (Hansen, US Pat 6162965). Согласно способу на этапе агробактериальной трансформации, используют химические ингибиторы некроза или выбирают агробактериальный штамм, который не индуцирует выраженный некроз, или используют генетический подход, при котором вместе с интересующим геном в растительные клетки переносится ген специфического фактора ингибирования некроза. Такие факторы известны давно, но они обладают крайне узким видоспецифичным характером активности. Автор не приводит данных по влиянию снижения некроза на снижение общего уровня соматоклональных отклонений.

Известные модификации способов трансформации оказывали влияние чаще всего на частоту регенерации трансгенных побегов, либо на частоту формирования трансгенного каллуса. Ни один усовершенствованный способ не приводил к значительному снижению соматоклональных отклонений и морфологических изменений трансгенных растений с повышенной устойчивостью к грибам-фитопатогенам. Например, при экспрессии тауматина в трансгенных растениях огурца (Szwacka et al. 2002) повышение устойчивости к *Pseudoperonospora cubensis* обнаруживались только у части трансгенных линий, а уровень экспрессии рекомбинантного белка не коррелировал с уровнем устойчивости.

Известно большое число растительных белков, которые в той или иной степени токсичны для фитопатогенов и могут быть использованы при получении растений устойчивых к грибам-патогенам. Сюда в первую очередь относится обширная группа PR-протеинов (pathogenesis-related proteins), включающая пять семейств PR-1 – PR-5 (Linthorst 1991). Также к ним относятся антимикробные пептиды (тионины, дефензины и лектины) и рибосомо-инактивирующие протеины. Антигрибная активность лучше всего изучена у белков, относящихся к двум семействам PR-3 (глюканазы) и PR-4 (хитиназы). Оба типа белков относятся по механизму активности к гидролизующим ферментам, разрушающим структурные компоненты клеточной стенки грибов.

Семейство PR-5 или тауматин-подобные белки в этом плане изучены значительно слабее. Они могут проявлять антигрибную активность против широкого спектра грибов патогенов (Abad et al. 1996), например, таких как *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasitica*, *Bipolaris maydis*, *Bipolaris zeicola*, *Phytophthora fragariae*, *Verticillium alboatrum*, *Mycosphaerella*

*fragariae*, *Diplocarpon earliana*, *Dendrophoma obscurans*, *Botrytis cinerea*, *Sphaerotheca humuli*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, и др. Нет однозначных сообщений и об антибактериальной активности тауматин-подобных белков в трансгенных растениях. Известно, что, как и остальные группы PR

5 белков они, по-видимому, выполняют в растительных клетках защитную функцию. Например, известно, что экспрессия PR-5 (TL) протеинов в растениях активируется атаками патогенов, механическими повреждениями, а также такими метаболитами как салициловая кислота и ABA (Stintzi et al. 1993). Также известно, что такой тауматин-подобный белок из кукурузы, как зеаматин

10 проявляет антигрибную активность *in vitro*, но лишь в сочетании с антибиотиком никкомицин Z ингибирующим синтез хитина (Roberts et al. 1990). Таким образом, зеаматин выступает кофактором усиливающим действие сублетальной концентрации антибиотика. В таких же условиях проявляет антигрибную активность и тауматин.

15 Dolgov et al. (1999) переносили ген тауматина в растения яблони, моркови, груши и земляники. Авторы подтвердили только интеграцию гена в геном растений, но экспрессия белка в трансгенных тканях не анализировалась.

Schestibratov et al. (2001) используя известный способ генетической трансформации (James et al. 1990 и Nehra et al. 1990) получили растения

20 земляники садовой с геном тауматина. Только у нескольких трансгенных линий была подтверждена экспрессия рекомбинантного белка.

Ни один из известных способов не дает возможности получать трансгенные растения, например земляники садовой, с экспрессией тауматин-подобных белков и в частности тауматина, проявляющие повышенную устойчивость к

25 фитопатогенам и с низким уровнем соматональных отклонений.

Известен US Patent 5,856,154 (Ryals et al. 1999), на способ защиты растений от патогенов, в основе которого лежит создание химерных генов кодирующих белки группы PR-1 и применение химических агентов для создания условий развития системно индуцируемой резистентности (SAR). Авторы осуществляют выбор

30 типа генетических конструкций с учетом использования фактов по системно индуцируемой резистентности растений, которая вырабатывается растениями в ответ на влияние внешних факторов.

Известен также способ создания трансгенных растений путем введения в растение двух генов, продуцирующих эффект SAR (Baker et al. US Patent

Appl.20020004944, 2002). Тем не менее, в данных работах нет данных подтверждающих тот факт, что трансформируемые растения в итоге обладают не только устойчивостью, но и сохраняют все морфологические характеристики.

## 5 Раскрытие изобретения

Одним из объектов изобретения является усовершенствованный способ агробактериальной трансформации и регенерации трансгенных растений, который характеризуется низкой частотой некроза эксплантов, повышенной частотой транзистентной экспрессии, повышенной частотой регенерации 10 трансгенных побегов, более высокой долей прямых трансформантов, за счет формирования в листовых дисках индуцируемой резистентности к абиотическим и биотическим стрессам что, в конечном итоге приводит к снижению частоты соматоклональных изменений в трансгенном растении.

В соответствии с усовершенствованным способом, этапы подготовки, инокуляции и кокультивации эксплантов, содержат следующие стадии: 15

i) стадию выбора одного или более листовых сегментов для подготовки эксплантов; ii) подготовку листовых дисков путем отделения от каждого листового диска сегмента и последующей инокуляции и кокультивации листовых дисков с агробактериями; iii) стадию удаления с листовых дисков избытка 20 агробактерий, отделения со стороны первого среза первой партии эксплантов; iv) стадию переноса эксплантов на среду селекции и регенерации; v) подготовку последующих партий эксплантов в соответствии с пунктами iii) и iv) до формирования последней партии эксплантов из выбранных листовых дисков; причем подготовка каждой из последующих партий эксплантов выполняется 25 после временного интервала необходимого для трансформации растительных клеток и формирования в листовых дисках индуцируемой резистентности к абиотическим и биотическим стрессам.

К следующему объекту изобретения относится векторная конструкция, которая содержит генетический материал, кодирующий, по крайней мере, один 30 белок входящий в группу целевых белков и/или белков ответственных за повышение устойчивости к фитопатогенам и/или снижение некроза.

К другому аспекту изобретения относится то, что генетический материал кодирует устойчивость трансгенного растения к грибам, выбираемым из группы: *Phytophthora fragariae*, *Verticillium alboatrum*, *Mycosphaerella fragariae*,



*Diplocarpon earliana*, *Dendrophoma obscurans*, *Botrytis cinerea*, *Sphaerotheca humuli*.

Другим объектом изобретения является способ получения трансгенного растения входящего в группу двудольных растений яблони, груши, земляники садовой, моркови и томатов.

К следующему объекту изобретения относится способ получения трансгенного растения земляники садовой, выбираемое из группы сортов: Selekt, Chambly, Chandler, Oka, Joliette, Yamaska, L'Acadie, L'Authentique Orleans, Rosalyn, Roseberry, Saint-Pierre, Donna, Enzed Levin, Enzed Lincoln, Vilanova, Durval, Redcrest, Bountiful, Redgem, Pelican, Primtime, Mohawk, Latestar, Winoma, Фейерверк.

Краткое описание фигур чертежей

Фиг. 1 А. Схема плазмиды pUR528.

Фиг. 1 Б. Схема плазмиды pBBThau.

Фиг.1 В. Рестрикционный фрагмент XbaI-BamHI из плазмиды pBBThau, несущий последовательность preprothaumatin II.

Фиг. 2. Схема бинарного вектора pBIThau35. LB и RB – левый и правый краевые повторы Т-ДНК; pAnos – терминатор из гена нопалинсинтетазы; pNOS – промотор из гена нопалинсинтетазы; p35S – промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; nptII – ген растительного селективного маркера неомизинфосфотрансферазы; thauII – последовательность preprothaumatin II кодирующая суперсладкий белок тауматин II.

Фиг. 3. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на частоту некроза в тканях эксплантов земляники садовой сорта Фейерверк.

Фиг. 4. Влияние по-стадийной кокультивации с *A. tumefaciens* на транзистентную GUS-экспрессию в тканях эксплантов земляники садовой сорта Фейерверк.

Фиг. 5. Влияние по-стадийной кокультивации на частоту формирования тканей устойчивых к канамицину (Km+) на исходных эксплантах земляники садовой сорта Фейерверк.

Фиг. 6. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на частоту регенерации трансгенных побегов земляники садовой сорта Фейерверк.

Фиг. 7. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на транзистентную GUS-экспрессию в тканях эксплантов яблони.

Варианты осуществления изобретения.

- 5 В основе усовершенствованного способа получения трансгенных растений, на примерах земляники садовой и яблони, лежит применение естественных молекулярных механизмов, которые активируются в растениях в процессе развития локально индуцируемой резистентности к абиотическим и биотическим стрессам.
- 10 Способ получения трансгенных растений с улучшенными агрономическими характеристиками состоит из следующих этапов.
- На первом этапе осуществляют выбор свойств трансгенного растения и создают векторные конструкции для переноса необходимого генетического материала в растительные клетки.
- 15 На втором этапе проводят выбор сорта (генотипа), осуществляют подготовку маточных растений для их последующей стерилизации и введения в культуру *in vitro*, проводят микроклональное размножение растительного материала и подготовку укорененных растений *in vitro*, которые послужат источником листовых эксплантов.
- 20 На третьем этапе осуществляют агробактериальную трансформацию с использованием сконструированных векторных плазмид. С этой целью проводят подготовку бактериальной суспензии, проводят сбор и подготовку листьев и осуществляют по-стадийную инокуляцию и кокультивацию эксплантов в соответствии с усовершенствованным способом.
- 25 На следующем этапе осуществляют селекцию трансгенной ткани, отбор трансформантов и элиминацию агробактерий и проводят микроклональное размножение отобранных трансформантов.
- После получения трансгенных растений проводят молекулярно-генетический анализ трансгенных линий. С этой целью осуществляют выделение тотальной ДНК из тканей трансгенных линий, проводят ПЦР анализ интеграции гетерологичной ДНК и гистохимический анализ GUS-активности, а также проводят процедуру Western-блоттинга для анализа экспрессии целевого гена в листьях и плодах трансгенных линий.
- 30

На заключительном этапе, с целью селекции линий без соматических отклонений, проводят биологическое тестирование: анализ устойчивости к фитопатогенам; органолептический анализ плодов; оценку вегетативной и генеративной активностей трансгенных растений в полевых условиях.

5 В усовершенствованном способе трансформации стадия подготовки, инокуляции и кокультивации эксплантов с агробактериями выполняется постадийно следующим образом.

10 Экспланты из одних и тех же листьев нарезаются не одновременно, перед инокуляцией, а, по крайней мере, за более двух независимых подходов с периодичностью в 1 до 5 суток, более предпочтительно через 3 суток. Количество шагов выбирают в диапазоне от 2 до 5, более предпочтительно от 3 до 4.

Ширину экспланта выбирают в пределах от 0,5 до 10 мм. Предпочтительно, ширину экспланта выбирают в пределах от 1 до 3 мм. Соотношение между длиной среза и площадью экспланта выбирают в диапазоне от 0,1 до 2 мм / мм<sup>2</sup>,  
15 более предпочтительное значение составляет 0,5 мм / мм<sup>2</sup>.

С целью повышения эффективности трансформации в состав среды селекции и регенерации входят регуляторы роста и/или селективные агенты. В качестве регуляторов роста используют цитокинины и/или ауксины. Например, в качестве цитокининов могут быть использованы синтетические производные  
20 фенилмочевины, а в качестве ауксинов – ИМК, ИУК, НУК, 2,4-Д и их конъюгаты с аминокислотами. Тем не менее, для повышения индуцируемой резистентности к абиотическим и биотическим стрессам, регуляторы роста могут быть исключены из состава среды кокультивации. Селективный агент выбирают из группы, в которую входят: неомицин, канамицин, гигромицин, фосфинотрицин.  
25 Комбинация, соотношение и концентрация перечисленных компонентов подбираются в зависимости от генотипа.

Например, в случае трансформации земляники садовой, концентрацию ТДЗ выбирают в диапазоне от 1 до 10 мг/л. Оптимальная концентрация ТДЗ составляет 5 мг/л. Концентрацию ИМК выбирают в диапазоне от 0 до 2 мг/л.  
30 Оптимальная концентрация ИМК составляет 0,3 мг/л. Концентрацию канамицина выбирают в диапазоне от 10 до 100 мг/л. Оптимальная концентрация канамицина составляет 50 мг/л.

Для получения трансгенного растения с заданными свойствами используют векторные конструкции созданные известным способом (Maniatis T. et al. 1982),

содержащие в своем составе генетический материал, который выбирают из группы, состоящей из: а) генетического материала, кодирующего по крайней мере один целевой белок; б) генетического материала, кодирующего по крайней мере один белок, который содействует снижению некроза на стадии трансформации; в) генетического материала, кодирующего, по крайней мере, один белок, который повышает устойчивость растения к фитопатогенам, и который, выбирают из группы: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5; г) генетического материала, кодирующая последовательность которого может состоять из комбинации по крайней мере двух последовательностей относящихся к подпунктам а) и б), или а) и в), или б) и в), или а), б), в).

Для получения растения с повышенной устойчивостью к патогенам в состав генетической конструкции входят гены, кодирующие устойчивость к грибам, которые выбирают из группы, состоящей из *Phytophthora fragariae*, *Verticillium alboatrum*, *Mycosphaerella fragariae*, *Diplocarpon earliana*, *Dendrophoma obscurans*, *Botrytis cinerea*, *Sphaerotheca humuli*.

Например, для получения трансгенного растения земляники садовой с повышенной устойчивостью к *Botrytis cinerea* используют векторную конструкцию pBIT<sub>hau35</sub>, в состав которой входит ген *thaumatin II* (Schestibratov et al. 2002).

В результате генетической трансформации получают растения которые содержат генетический материал, кодирующий, по крайней мере, один белок входящий в группу целевых белков и/или белков ответственных за повышение устойчивости к фитопатогенам и/или снижение некроза.

В качестве целевого продукта могут быть использованы белки, которые: а) повышают пищевую ценность, б) улучшают вкус, в) придают устойчивость к гербицидам, г) имеют фармацевтическое значение.

Усовершенствованный способ генетической трансформации может быть использован для растений, относящихся к группам однодольных и двудольных.

Для создания трансгенных растений с повышенной пищевой ценностью, улучшенным вкусом и повышенной устойчивостью к фитопатогенам могут быть выбраны двудольные растения.

Например, для трансформации используют растения, выбираемые из группы: яблони, груши, земляники садовой, моркови и томатов.

Могут быть получены трансгенные растения земляники садовой, выбираемые из группы сортов: Selekt, Chambly, Chandler, Oka, Joliette, Yamaska, L'Acadie, L'Authentique Orleans, Rosalyne, Roseberry, Saint-Pierre, Donna, Enzed Levin, Enzed Lincoln, Vilanova, Durval, Redcrest, Bountiful, Redgem, Pelican, Primtime, Mohawk, Latestar, Winoma, Фейерверк.

Примеры в детальном описании приводятся для земляники садовой сортов Фейерверк и Selekt и яблони сорта Мельба.

Для практического применения могут быть использованы компоненты трансгенного растения: трансгенные клетки, органы (листья, стебли, корни, цветки), целые растения, семена и плоды.

Внесенные изменения в способ агробактериального переноса позволяют получить следующие улучшения в параметрах как самого способа, так и в характеристиках трансгенных растений. Способ позволяет: снизить частоту развития некротических реакций на трансформируемых эксплантах (Фиг. 3); , повысить частоту транзientной экспрессии интродуцируемых генов (Фиг. 4); повысить частоту формирования новых трансгенных тканей на исходных эксплантах (Фиг. 5); повысить соотношения прямых регенерантов по отношению к числу регенерантов полученных через каллусную стадию (Таблица 6); повысить частоту регенерации трансгенных побегов (Фиг. 6); наконец, среди трансгенных линий увеличить долю растений без соматоклональных изменений (Таблица 11).

#### Экспериментальные протоколы

Данные экспериментальные протоколы относятся к способам, условиям и компонентам сред для процедуры получения трансгенных растений с повышенной устойчивостью к фитопатогенам и улучшенными вкусовыми свойствами на примере земляники садовой. Данные протоколы включают, но не ограничивают изменения параметров концентраций, временных условий, и других изменений которые очевидны из общего уровня техники и входят в область защиты данного изобретения.

#### А. Материалы и способы используемые при получении трансгенного растения

Конструирование векторной плазмиды для переноса в растительные клетки последовательности *preprothaumatin II*, кодирующей белок тауматин II.

Ген тауматин II кодирует суперсладкий белок, который в природе встречается в плодах *Thaumatococcus danielli*, из которых он и был выделен, охарактеризован. Последовательность представляет собой *preprothaumatin II* – предшественник зрелого тауматина, в состав которого входит нативный сигнальный пептид.

5 Клонирование кДНК тауматина описано в статье (Edens et al. 1982). Применение для экспрессии в клетках *E.coli* показано Verrips et al. (US Patent 4,891,316).

Векторная плазмида для переноса в растительные клетки последовательности *preprothaumatin II*, кодирующей белок тауматин II, конструировалась с использованием хорошо известных методов молекулярного клонирования  
10 (Sambrook et al., 1989).

Для переноса данного гена в растительные клетки за основу была взята плазмида pBI121 (фирма Clontech). Последовательность гена *gus* в ней заменялась фрагментом *preprothaumatin II* из плазмиды pUR528 (Unilever Research Laboratory, The Netherlands; Edens et al. 1982; (Фиг. 1А). Фрагмент  
15 *preprothaumatin II* из плазмиды pUR528 вырезался по сайтам EcoRI и HindIII. Промежуточный вектор pBV (селективный маркер Ap) несущий в своем составе полилинкер SphI-XbaI-XhoI-EcoRI-SmaI-AvaI-BamHI-XbaI-SauI-PstI-HindIII-BamHI-BstXI-NciI инкубировался с рестриктазами EcoRI и HindIII. Фрагмент *preprothaumatin II* с липкими концами по сайтам EcoRI и HindIII лигировался в  
20 линеаризованный вектор pBV по тем же сайтам. Полученную плазмиду pBVThau (Фиг. 1Б) инкубировали с рестриктазами XbaI и BamHI, для того чтобы снова вырезать фрагмент *preprothaumatin II* только уже с новыми липкими концами (Фиг. 1В). Бинарный вектор pBI121 сначала инкубировали с рестриктазами SmaI и SacI, затем лигировали по тупым концам линеаризованную форму плазмиды,  
25 затем препарат инкубировали с рестриктазами XbaI и BamHI. В линеаризованный вектор pBI121 лигировали фрагмент XbaI-BamHI последовательности *preprothaumatin II*, предварительно вырезанный из вектора pBVThau. Схема вектора pBIThau35 представлена на Фиг. 2.

Среды культивирования земляники садовой *in vitro* и проведения  
30 генетической трансформации. Среды мультипликации (М), элонгации и укоренения (ЕР), кокультивации (СС) и регенерации трансформантов (RT) готовят в соответствии с данными, приведенными в таблице 1. pH во всех средах доводится до 5,7.

Таблица 1. Среды культивирования земляники садовой *in vitro* и проведения генетической трансформации.

5	Компоненты	Концентрация			
		Среда М	Среда ER	Среда CC	Среда RT
	Калия нитрат	316 мг/л	316 мг/л	2900 мг/л	2900 мг/л
	Аммония нитрат	400 мг/л	-	1650 мг/л	1650 мг/л
	Калия фосфат однозамещенный	170 мг/л	170 мг/л	170 мг/л	170 мг/л
10	Кальция нитрат · 4 H <sub>2</sub> O	1133 мг/л	1133 мг/л	-	-
	Кальция хлорид	-	-	332,2 мг/л	332,2 мг/л
	Магния сульфат 7 H <sub>2</sub> O	369 мг/л	369 мг/л	180,7 мг/л	180,7 мг/л
	Микросоли MS	32,83 мг/л	32,83 мг/л	32,83 мг/л	32,83 мг/л
	Железа сульфат · 7 H <sub>2</sub> O	27,8 мг/л	27,8 мг/л	27,8 мг/л	27,8 мг/л
15	Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	37,26 мг/л	37,26 мг/л	37,26 мг/л	37,26 мг/л
	Сахароза	30 г/л	20 г/л	30 г/л	30 г/л
	Витамины MS	3,5 мг/л	3,5 мг/л	3,5 мг/л	3,5 мг/л
	Мио-инозитол	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л
20	Агар	8 г/л	8 г/л	8 г/л	8 г/л
	БАП	1 мг/л	-	-	4 мг/л
	ТДЗ	-	-	-	1 мг/л
	ИМК	-	-	-	0,3 мг/л

## 25 Выбор сорта и подготовка маточных растений.

В экспериментах по генетической трансформации земляники использовался материал *in vitro* растений: а) сорта Фейерверк (Зубов А.А., ВНИИ генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина, г. Мичуринск) и б) сорта Selektа (Evans E., Южная Африка, 1973г, PI 551873).

30 Введение земляники садовой в культуру *in vitro* проводили путем стерилизации молодых верхушечных почек с усом растений открытого грунта. Для этого концевые почки срезали с небольшим фрагментом побега не более 5-10 мм, затем очищали от поверхностных листочков, замачивали в водном растворе Tween 20 на 1 час, после чего промывали под проточной водой в  
35 течение 2 часов. Отмытые экспланты для стерилизации выдерживали 1-5 мин, в

зависимости от их размера и возраста, в 2 %-ом растворе гипохлорита натрия. После чего их промывали трижды в 100 мл стерильной дистиллированной воды.

Поверхностно стерилизованные побеги рассаживали отдельно в пробирки с 10 мл среды для мультипликации (среда М, см Таблица 1). Основные  
5 компоненты данной среды соответствуют усовершенствованной по Voxus (1974) среде MS (Murashige et al. 1962), только с двумя изменениями: во-первых, глюкоза в концентрации 22 г/л заменена 30 г/л сахарозы; во-вторых, для стимуляции мультипликации среда дополнена 5 мМ нитрата аммония. После  
10 месяца в культуре незараженные экспланты с вновь сформировавшимися побегами целиком пересаживали на среду элонгации и укоренения (среда ER, см Таблица 1), которая отличается от среды М отсутствием регуляторов роста, добавочного нитрата аммония и сниженной концентрацией сахарозы (2%). В среднем через 4-6 недель подросшие побеги отделяют друг от друга и рассаживают на свежую среду того же состава для стимуляции укоренения.  
15 Укорененные растения использовали в качестве источника листовых дисков в последующих экспериментах по регенерации и трансформации. Такие растения культивируют на среде ER в течение 7-8 месяцев с ежемесячной пересадкой на свежую среду. Для выращивания стерильного материала земляники использовали специальные культуральные банки производства HortiMic  
20 (Финляндия) емкостью 250 мл, закрывающиеся пластиковой закручивающейся крышкой.

#### Подготовка бактериальной суспензии.

Для генетической трансформации бинарными векторами pBI121 и pBIThau35 использовали супервирулентный штамм *Agrobacterium tumefaciens*  
25 CBE21 (Ревенкова и др. 1994), сконструированный на основе дикого штамма *A. tumefaciens* с Ti-плазмидой pTiBo542.

Бактериальные суспензии штаммов CBE21/pBIThau35 и CBE21/pBI121 для инокуляции эксплантов наращивали в течение ночи в 50 мл среды LB (Таблица 2) при 28° С. Перед инокуляцией суспензию клеток центрифугировали при 5 т.о.  
30 в течение 5 минут. Осадок промывали дважды 50 мл жидкой среды MS для удаления остатков среды LB. Промытый осадок клеток ресуспендировали в жидкой среде MS, затем плотность суспензии доводили до ОП600 равной 1.



Таблица 2. Среда LB для культивирования агробактерий.

Компонент	Концентрация
Натрия хлорид	10 г/л
Бакто триптон	10 г/л
Дрожжевой экстракт	5 г/л
pH	7,5

5

10      Сбор и подготовка листьев.

С маточных растений, приготовленных описанным выше способом, непосредственно перед постановкой генетической трансформации срезали молодые трехлистники, полностью развернувшиеся. Размер отдельного листового диска в каждом трехлистнике варьировал в пределах 10-15 мм (по направлению

15      центральной жилки). Чтобы уменьшить усыхание листьев в процессе последующих операций, их содержат в закрытых чашках Петри с небольшим количеством (20 мл) жидкой среды MS. Листья с растений срезают не чаще двух раз в месяц. Маточные растения до и после сбора листьев культивируют в одинаковых условиях, при 16 часовом световом дне.

20      Подготовка, инокуляция и кокультивация эксплантов.

Срезанные трехлистники разделяют на отдельные листовые диски, которые в свою очередь разрезают скальпелем на экспланты различными способами.

Усовершенствованный способ подготовки, инокуляции и кокультивации эксплантов.

25      В предлагаемом способе листовые диски разрезают скальпелем на чашке Петри в присутствии небольшого количества жидкой среды MS. От каждого листового диска размером 10-15 мм по (направлению центральной жилки) отрезают узкую полоску шириной не более 2 мм и затем выбрасывают. Оставшуюся большую часть листового диска (эксплант А-5) используют в

30      дальнейшем для инокулирования.

На первом шаге экспланты А-5 непосредственно после срезки края переносят аккуратно пинцетом в бактериальную суспензию и замачивают 30 мин. Затем экспланты А-5 переносят в чистые чашки Петри с бумажными фильтрами и подсушивают в течение 5 минут для удаления избытка бактерий, после чего

после чего раскладывают в чашки Петри со средой СС поверхность которой покрыта бумажным фильтром. Чашки заматывают парафином и инкубируют в термостате в темноте при температуре 25-28° С в течение 3 суток.

Затем экспланты А-5 переносят в стакан с жидкой средой MS, в течение 3-5 минут интенсивно перемешивают для удаления избытка бактерии. Отмытые экспланты переносят в чашки Петри с небольшим количеством жидкой среды MS. Со стороны первого среза от каждого из эксплантов А-5 скальпелем отрезают полосу шириной около 2 мм, формируя экспланты первой стадии. Экспланты А-1 собирают в стакан с жидкой средой MS с добавлением 500 мг/л цефотаксима и интенсивно перемешивают для удаления остатков агробактерий. После этого экспланты А-1 раскладывают в чашки Петри на поверхность среды RT тыльной стороной к среде. Чашки заматывают парафином и инкубируют в термостате в темноте при температуре 23-25° С. Экспланты А-5 снова возвращают на ту же среду СС, где предварительно меняют бумажный фильтр. Чашки заматывают парафином и инкубируют в термостате в темноте при температуре 25-28° С в течение следующих 3-х суток.

На втором шаге экспланты А-5 переносят в стакан с жидкой средой MS, в течение 3-5 минут интенсивно перемешивают для удаления избытка бактерии. Отмытые экспланты переносят в чашки Петри с небольшим количеством жидкой среды MS. Со стороны первого среза от эксплантов А-5 скальпелем отрезают следующую полосу шириной от 1 до 2 мм, формируя экспланты второй стадии. Экспланты А-2 собирают в стакан с жидкой средой MS с добавлением 500 мг/л цефотаксима и интенсивно перемешивают для удаления остатков агробактерии. После этого экспланты А-2 раскладывают в чашки Петри на поверхность среды RT тыльной стороной к среде. Чашки заматывают парафином и инкубируют в термостате в темноте при температуре 23-25° С. Экспланты А-5 снова возвращают на ту же среду СС, где предварительно меняют бумажный фильтр. Чашки заматывают парафином и инкубируют в термостате в темноте при температуре 25-28° С в течение следующих 3-х суток.

На третьем шаге и четвертом шагах из эксплантов А-5 формируют экспланты третьей А-3 и четвертой А-4 стадий в соответствии с процедурой описанной для второго шага.

На пятом шаге производят обработку последнего экспланта А-5, который переносят в стакан с жидкой средой MS, в течение 3-5 минут интенсивно

перемешивают для удаления избытка бактерии, после этого промывают жидкой средой MS с добавлением 500 мг/л цефотаксима для удаления остатков агробактерии. После этого экспланты А-5 раскладывают в чашки Петри на поверхность среды RT тыльной стороной к среде. Чашки закрывают парафином и инкубируются в термостате в темноте при температуре 23-25° С.

В качестве контрольного варианта используют известный способ подготовки, инокуляции и кокультивации эксплантов (James et al. 1990 и Nehra et al. 1990).

10 Селекция трансгенной ткани, отбор трансформантов и элиминация агробактерий.

Экспланты после инокуляции и кокультивации с агробактериями раскладывают в чашки Петри на поверхность среды RT, дополненную 600 мг/л гидролизата казеина, 500 мг/л цефотоксима и 50 мг/л канамицина. Чашки закрывают парафином и инкубируют в термостате в темноте при температуре 23-25° С. Цефотоксим используют для элиминации остатков агробактерий на эксплантах. Его концентрацию изменяют в течение пассажей: с каждым месячным пассажем, уровень снижают на 100 мг/л от исходных 500 мг/л до конечных 0 мг/л. Канамицин выступает в роли селективного агента, поскольку в векторных конструкциях в качестве селективного маркера используется ген неомицинофосфотрансферазы *nrpII*. Рабочая концентрация канамицина, достаточная для подавления роста нетрансгенной ткани земляники садовой, составляет 50 мг/л. Однако, для стимуляции регенерации адвентивных побегов, концентрацию канамицина в среде снижают вдвое после отделения каллусных кусочков от исходной ткани эксплантов и переноса их на свежую среду. Отделение трансгенного каллуса от отмирающей ткани эксплантов является ключевым моментом процесса селекции и регенерации трансформантов. Эффективность трансформации без этой процедуры существенно снижается.

Регенерация трансформантов земляники может протекать двумя способами: непосредственно из клеток эксплантов и/или через промежуточную каллусную стадию. В первом случае трансформанты появляются с первого по второй месяц селекции. Регенерация через каллусную стадию значительно растянута во времени, трансформанты могут появляться с третьего по шестой месяц культивирования на селективной среде.

### Мультипликация трансформантов.

Регенерировавшие побеги отделяют от исходной ткани эксплантов и переносят для мультипликации на среду М (Таблица 1), дополненную 0,1 мг/л ТДЗ и 25 мг/л канамицина. После месячного пассажа размножившиеся побеги  
5 целыми кластерами переносят на среду ER для стимуляции элонгации побегов. После 4-5 недель подросшие побеги отделяют друг от друга и рассаживают  
раздельно на свежей среде того же состава для стимуляции укоренения. Укоренение протекает в течение 4-6 недель. Укорененные растения  
используются в дальнейшем для адаптации к условиям теплицы и  
10 последующего молекулярно-генетического анализа и биологического тестирования.

### Б. Материалы и способы используемые для анализа свойств трансгенного растения

#### Выделение тотальной растительной ДНК земляники садовой.

15 Для экстракции геномной ДНК использовался растительный материал как *in vitro* так и *in vivo*. Из условий *in vitro* для растирования в жидком азоте брались  
целые побеги, культивируемые на среде для мультипликации. С тепличных растений срезались молодые еще не развернувшиеся листочки. В обоих случаях  
на чистоту препаратов сильное влияние оказывали возраст и физиологическое  
20 состояние растительной ткани. Для стерильного материала оптимальный  
возраст побегов составлял 3-4 недели, а для тепличного возраст листочков не  
более 5-6 дней. Выделение проводилось по модифицированному нами  
протоколу. За основу бралась методика Rogers et al. (1994) с применением 2<sup>x</sup>  
СТАВ-буфера.

25 В отличие от протокола Rogers et al. (1994) гомогенизированная ткань  
ресуспендируется в 1 мл промывочного буфера: 100 mM ацетата калия, pH 4.5,  
20 mM ЭДТА, 1 % PVP, 1 % 2-МЭ. Полученная суспензия центрифугируется 5  
мин при 4,5 т.о. Надосадочная жидкость удаляется. Осадок снова  
ресуспендируется в 600 мкл экстракционного СТАВ-буфера следующего  
30 состава: 100 mM трис-HCl, pH 8, 2.5 M NaCl, 20 mM ЭДТА, 2 % СТАВ, 40 mM 2-  
МЭ.

#### ПЦР-анализ трансгенных линий.

Линии, полученные с помощью любой из использованных векторных конструкций, анализируют двумя парами праймеров: на вставку селективного маркера (*nptII*) и на вставку смыслового (*thauII*) или репортерного генов (*uidA*).

ПЦР-анализ интеграции различных гетерологических последовательностей в геном земляники садовой проводят в реакционной смеси, которая содержит: 67  
5 mM Tris-HCl, pH 9.0, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% желатина, по 200 μM каждого dNTP. Концентрации праймеров и полимеразы, а также температурный режим подбирают для каждого конкретного случая.

Для амплификации фрагмента гена *nptII* в реакционную смесь вносят  
10 праймеры до 0,6 μM конечной концентрации и 0,05 U/μl Taq полимеразы. Режим амплификации: 5 мин денатурации при 94 °C (горячий старт), 30 с денатурации при 93 °C, отжиг – 45 с 62 °C, элонгация 45 с 72 °C, циклов амплификации 30. Ожидаемый размер амплифицируемого фрагмента 742 п.н.

Вставка *thauII* определялась при условиях по большей части схожих с  
15 таковыми для *nptII* только концентрация праймеров составляла 0,9 μM каждого, 0,1 U/μl полимеразы, а температурный режим изменен следующим образом: горячий старт 2 мин 94 °C, денатурация 30 с 93 °C, отжиг 40 с 63 °C, элонгация 35 с 72 °C, 35 циклов амплификации. Ожидаемый размер амплифицируемого фрагмента 878 нуклеотидов (Schestibratov et al 2002).

#### 20 Гистохимический анализ GUS-активности.

Гистохимическое определение активности GUS проводили по способу Jefferson (1987). Гистохимическое определение GUS активности проводили с использованием 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронида (X-GLUC, Duchefa). Для этого растительную ткань помещали в буфер 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 10 mM  
25 Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1% тритон X-100, содержащий 1 мг/л X-GLUC, инкубировали в течение 6 часов при 37°C. После чего несколько раз промывали 50% этанолом и хранили окрашенные ткани при 4°C в 70% этаноле.

#### Органолептический анализ плодов земляники садовой.

Плоды для проведения органолептического анализа собирали с трансгенных  
30 растений, культивируемых в полевых условиях на сертифицированном полигоне испытания трансгенных культур на территории карантинного питомника ВНИИСПК (г. Орел). Дегустировались плоды первого сбора урожая первого и второго годов культивирования. Плоды 12 независимых трансгенных

линий и контрольных растений оценивали по их вкусовым качествам, в первую очередь сладость. Сладость мякоти оценивали по пятибалльной системе, исходя из сортовой характеристики Фейерверка, согласно которой вкус среднеспелых плодов первого сбора не превышает оценки 3,8 – 4,0.

5 В связи со специфическими свойствами тауматина, формирующего длительное послевкусие, органолептический анализ проводили попарно. Для этого брались плоды двух различных растений и составлялись пары: а) линия с экспрессией тауматина – линия без экспрессии тауматина; б) линия с экспрессией тауматина – нетрансгенное растение.

10 Комбинации составлялись произвольно, с учетом только данных о присутствии или отсутствии белка. Между каждым образцом дегустаторы полоскали ротовую полость дистиллированной водой. Чтобы исключить или, по крайней мере, снизить влияние различий в спелости на корректность анализа, для дегустации выбирали плоды одного размера и окраски. Вес плодов  
15 колебался от 10 до 15 грамм. Одному дегустатору для сравнения на каждую линию предоставлялось по четыре дольки, каждая от разных плодов. Дегустаторы выставляли независимые оценки, средняя арифметическая из которых являлась оценкой вкуса для данного образца.

Анализ влияния экспрессии тауматина II на антигрибную устойчивость  
20 земляники садовой к *Botrytis cinerea*.

Культуру фитопатогена *Botrytis cinerea* выделяют из зараженных плодов земляники садовой сорта Фейерверк. Повторная реинокуляция незараженных  
плодов и листьев земляники подтвердила вирулентность выделенного и очищенного патогена. Культуру патогена в условиях *in vitro* поддерживали на  
25 картофельной среде PDA, в темноте при 28 С. Для приготовления этой среды использовали отвар очищенного картофеля в водопроводной воде (200 г картофеля на 1 литр воды, варить 30 мин после закипания). К отвару добавляли  
10 г/л глюкозы и 20 г/л бактериологического агара. Среду автоклавировали при давлении в 1 а. при 120°C в течении 20 мин. После автоклавирования к среде  
30 добавляли гидролизат казеина до конечной концентрации 300 мг/л.

Для приготовления суспензии спор использовали культуру гриба в возрасте 7-8 дней. После пассажа на свежую среду из спор в течении недели развивается новый мицелий и на 7-8-ой день начинается спороношение. Споры собирали стерильным шпателем, который каждый раз предварительно ополаскивают в

растворе в 25 мМ ацетата натрия (рН 5,2) с 0,5% глюкозы и детергента (2 капли Triton X100 на 20 мл). Плотность суспензии для всех биотестов доводилась до  $2-3 \times 10^6$  спор/мл. Подсчет плотности проводили в камере Горяева.

Трансгенные растения, полученные с помощью векторной конструкции pBIT<sub>hau35</sub>, анализировались на устойчивость к фитопатогену *Botrytis cinerea* по способу (Peng et al. 1991) с дополнительными усовершенствованиями, которые описаны ниже. Материал для тестирования брали с тепличных растений возрастом не более 4-6 месяцев. Перед инокуляцией листья слегка подвяливались при комнатной температуре. Инокуляцию проводили путем смачивания листьев суспензией спор в течение 1-2 мин. Инокулированные листья раскладывали в чашки Петри на влажные фильтры и инкубировали в течение суток в темноте при 28°C. Затем листья стерилизовали в 0,5% растворе гипохлорита натрия в течение 2 мин. Стерилизующий агент отмывали трижды 100 мл стерильной дистиллированной воды. С листьев нарезали листовые диски пробковым сверлом диаметром 7 мм. С каждого трехлистника по 10 дисков. В отличие от известного способа, диски раскладывались на увлажненные фильтры, а не на агаризованную среду с добавками параквата и хлорамфеникола.

Опытный и контрольный материал сравнивался попарно в пределах одной чашки Петри, чтобы избежать влияния флуктуаций влажности фильтров и воздуха внутри камеры. Уже нарезанные и разложенные листовые диски инкубировали при тех же условиях, что и целые листья. На десятый день проводили оценку развития инфекции на основе трех критериев: 1) степени развития поверхностного мицелия; 2) площади некротического поражения листовых дисков; 3) степени спороношения. Первый и третий критерии оценивались в баллах от 0 до 5. Степень некроза оценивали в процентах площади пораженной части диска.

Полевые испытания трансгенных растений земляники садовой с геном суперсладкого белка тауматин II

Большая часть трансгенных растений, полученных с помощью вектора pBIT<sub>hau35</sub>, была передана в карантинный питомник ВНИИСПК (г. Орел) для высадки в открытый грунт и проведения полевых испытаний. При посадке трансгенных линий и контрольных растений проводили рандомизацию. Растения, предназначенные для посадки (5-10 для отдельной линии)

распределяли на три группы, каждую из которых высаживали в разных местах сертифицированного участка.

От каждого маточного растения укореняли по четыре новых розетки от сформировавшихся усов. Остальные усы регулярно удаляли, чтобы не  
5 загущалась посадка. Перед началом цветения участок накрывался защитным материалом, для предотвращения распространения пыльцы трансгенных растений. Над каждым из трех рядов сооружали отдельное покрытие высотой около 60 см. После сбора первого урожая плодов проводили оценку вегетативной и репродуктивной активностей высаженных растений. У каждого  
10 маточного растения подсчитывали количество розеток в кусте, число цветоносов, а также среднюю высоту куста. Через месяц после сбора второго урожая плоды первого и второго сборов использовали для анализа экспрессии тауматина способом Western-блоттинга, а также для органолептической оценки влияния гетерологичного белка на вкус плодов.

15

#### Примеры

Пример 1. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на частоту некроза в тканях эксплантов земляники садовой сорта Фейерверк.

Частота некроза эксплантов оценивалась визуально после 15 дней  
20 культивирования на селективной среде. Сравнивали растительный материал, трансформируемый по стандартному и усовершенствованному способам. Из полученных данных можно сделать вывод, что усовершенствование стадий инокуляции и кокультивации положительно сказывается на выживании эксплантов и предотвращении развития некротических реакций в местах  
25 поранений. Данные по средней частоте некроза эксплантов трансформируемых по усовершенствованному (А)- 16,6% и известному (Б) - 54,8 % способам, показывают, что некроз тканей снижен почти в 3,5 раза. Данные представлены на Фиг 3.

Пример 2. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на транзистентную GUS-экспрессию в тканях эксплантов земляники садовой сорта Фейерверк.

30

При генетической трансформации с использованием *Agrobacterium tumefaciens* Т-ДНК с необходимыми гетерологичными последовательностями переносится в растительные клетки преимущественно в участках поранения, где



обеспечивается прямой контакт бактерий с поврежденными клетками. Для оценки эффективности предлагаемого способа проводился гистохимический анализ GUS-активности в тканях эксплантов по окончании периода кокультивации. Такой анализ позволяет оценить частоту переноса и экспрессии рекомбинантных генов в составе Т-ДНК из бактерий в растительные клетки. Растительный материал для анализа отбирают по истечению 3-х суточного периода кокультивации, сразу же после отмывки эксплантов от бактерий. Гистохимическое окрашивание эксплантов проводят в течение 7 часов при 37°C в растворе X-Gluc для гистохимического анализа GUS-активности. Результаты анализа приведены на Фиг. 4.

Пример 3. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на частоту формирования устойчивых к канамицину тканей (Km<sup>+</sup>) на исходных эксплантах земляники садовой сорта Фейерверк.

При последующем культивировании (после их по-стадийной кокультивации с агробактериями) на среде RT, дополненной цефотаксимом 500 мг/л, и канамицином 50 мг/л, в течение первых двух месячных пассажей на эксплантах происходит формирование прямых трансформантов и неорганизованных каллусных групп. Km<sup>+</sup> ткани (регенеранты и каллусные группы) формируется преимущественно по участкам поранения.

К концу второго пассажа проводился подсчет доли эксплантов на которых формировалась трансгенная ткань. От стадии А-1 до А-4 наблюдается стабильное возрастание частоты формирования Km<sup>+</sup> тканей. По-видимому, это связано, во-первых, с уменьшением интенсивности некротических реакций в ответ на поранение и последующую кокультивацию в агробактериями, во-вторых, с возможным повышением морфогенного потенциала. На стадии А-4 зафиксирована максимальная доля эксплантов сформировавших трансгенные ткани (89,5 %, см Фиг. 5). Снижение доли эксплантов сформировавших трансгенные ткани в группе А-5 (54,9 %) объясняется тем, что на пятой стадии уже снижается количество растительных клеток компетентных для генетической трансформации. В контрольной группе Б трансгенная ткань формировались на 27,1 % эксплантов, что хорошо коррелирует с высокой частотой некроза (54,8 %, см Пример 1).

Пример 4. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на частоту регенерации трансгенных побегов земляники садовой сорта Фейерверк.

Частота регенерации трансгенных побегов является одним из основных  
5 показателей эффективности способа генетической трансформации. Она складывается из эффективностей отдельных этапов, начиная с подготовки эксплантов и заканчивая составом среды селекции и регенерации трансформантов, и отражает число стабильных независимых трансформантов при пересчете на исходное число инокулированных эксплантов.

10 Общее число трансформантов подсчитывалось после четырех месячных пассажей на среде RT и одного пассажа на среде М, дополненной цефотаксимом и канамицином. Данные приводятся на Фиг. 6. Из диаграммы видно, что от группы А-1 до А-4 эффективность трансформации плавно возрастает, а затем при переходе к А-5 незначительно уменьшается. Последнее, скорее всего,  
15 связано со снижением частоты транзientной GUS экспрессии в этой группе, что в свою очередь снижает частоту формирования трансгенных тканей. Другая возможная причина – снижение морфогенного потенциала при длительном культивировании на безгормональной среде СС. Однако показатель в любом случае выше, чем в контрольной группе Б. Средний показатель для групп А-1 –  
20 А-5 составляет 1,72 %, что почти в два раза выше контрольного варианта. Таким образом, по-стадийная кокультивация эксплантов повышает частоту регенерации трансгенных побегов.

Пример 5. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на соотношение прямых трансформантов и трансформантов полученных через  
25 каллусную стадию.

Известно, что соотношение прямых трансформантов и трансформантов полученных через каллусную стадию зависит главным образом от  
генотипических особенностей растения (Marcotrigiano et al. 1987; Sutter et al. 1997; Mогозова, 2002). Разработанный метод генетической трансформации  
30 земляники садовой с модифицированным протоколом подготовки, инокуляции и кокультивации эксплантов характеризуется более высокой долей прямых трансформантов (Таблица 3).

Таблица 3. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на соотношение прямых трансформантов и трансформантов полученных через каллусную стадию.

5	Протокол	Сорт	Частота трансформации %	Доля прямых трансформантов, %
	По усовершенствованному способу постадийной кокультивации (А)	Фейерверк	3,7	87,5
10		Selekta	8,9	93,8
	По известному способу (James et al (1990) и Nehra et al (1990) (Б)	Фейерверк	1,0	28,3
		Selekta	1,8	42,0

15 Пример 6. Данные ПЦР анализа трансгенных растений земляники садовой сорта Фейерверк, полученных с помощью бинарного вектора pBIT<sub>thau</sub>35.

Schestibratov et al. (2002) используя усовершенствованный способ генетической трансформации получили трансгенные растения земляники садовой с геном тауматина. С целью изучения встраивания Т-ДНК в геном  
20 канамицин-резистентных линий, полученных в результате генетических трансформаций посредством бинарного вектора pBIT<sub>thau</sub>35 проводился ПЦР-анализ образцов тотальной ДНК. Поскольку данный вектор обеспечивает перенос в ядерный геном двух генов *nptII* и *thauII*, интродукция Т-ДНК анализировалась отдельно по каждой последовательности.

25 Все 23 независимые трансгенные линии получены при поэтапной селекции на канамицине концентрацией 50 и 25 мг/л соответственно в первом и последующих пассажах. В последующем полученные регенеранты укоренялись на среде с 25 мг/л канамицина. ПЦР-анализ образцов тотальной ДНК на предмет присутствия фрагмента в 742 п.о. гена *nptII* показал, что все линии  
30 содержат геномную вставку изучаемой последовательности. Результаты ПЦР-анализа представлены в Таблице 4.

Анализ тех же образцов тотальной ДНК с использованием пары праймеров к последовательности гена *thauII* выявил, что не все *nptII*-положительные линии содержат вставку гена тауматина II. ПЦР-анализ показал, что

амплифицируемый фрагмент размером 878 п.о. присутствовал в 18 из 23 анализируемых образцов. Трансгенные линии Клон 6, Клон 9, Клон 13, Клон 17 и Клон 20, несмотря на присутствие функционирующей вставки гена *prtII* не содержали последовательность тауматина II. Результаты ПЦР-анализа 5 представлены в Таблице 4.

Пример 7. Данные Western-blot анализа трансгенных растений земляники садовой сорта Фейерверк, полученных с помощью бинарного вектора pBIT<sub>hau35</sub>.

Функциональность интродуцированной экспрессирующей кассеты 35S-  
10 *thaumatin-3'nos* анализировалась способом Western-блоттинга. Иммунодетекция белка в вегетативных тканях (листьях) показала, что экспрессирующая кассета функционирует и белок синтезируется в 15 из 18 *thauII*-положительных незивисимых линий. В трансгенных линиях Клон 2, Клон 4 и Клон 12 тауматин не экспрессируется. Причиной, объясняющей этот факт, может быть дефектная  
15 вставка кассеты 35S-*thaumatin-3'nos* или эндогенная супрессия гомологичными последовательностями. В листьях нетрансгенных растений, также как и в линиях Клон 6, Клон 9, Клон 13, Клон 17 и Клон 20 без вставки 35S-*thaumatin-3'nos* присутствие тауматина II не обнаружено. Сводные результаты проведенного Western-блоттинг анализа в листьях трансгенных линий приводятся в Таблице 4.

20 Иммунологический анализ экспрессии тауматина в плодах трансгенных линий также подтвердил присутствие белка (Таблица 4.). Данные коррелируют с экспрессией тауматина в листьях.

Пример 8. Данные органолептического анализа плодов земляники садовой сорта Фейерверк.

25 Дегустации проводились на урожаях земляники садовой за два года культивирования на полигоне испытаний генетически усовершенствованных растений (ВНИИСПК, г. Орел). Результаты дегустаций первого года приведены в Таблице 5. Ограниченное количество ягод урожая первого года не позволило провести органолептический анализ статистически достоверно, однако средние  
30 баллы оценивающие сладость плодов, подтверждают изменение вкусовых качеств плодов у ряда трансгенных линий. Сладость мякоти оценивалась по пятибалльной системе, исходя из сортовой характеристики Фейерверка, согласно которой вкус среднеспелых плодов первого сбора оценивается в среднем на 4 балла.

Таблица 4. Результаты ПЦР и Western-блоттинг анализов трансгенных линий земляники садовой (клоны 1-23) и сорта Фейерверк.

5	Тип растения	ПЦР анализ на ген <i>npt II</i>	ПЦР анализ на ген <i>tha1 II</i>	Иммунодетекция тауматина в листьях	Иммуно- детекция тауматина в плодах
	Клон 1	+	+	+	+
10	Клон 2	+	+	-	-
	Клон 3	+	+	+	+
	Клон 4	+	+	-	-
	Клон 5	+	+	+	+
	Клон 6	+	-	-	-
15	Клон 7	+	+	+	+
	Клон 8	+	+	+	+
	Клон 9	+	-	-	-
	Клон 10	+	+	+	+
	Клон 11	+	+	+	+
20	Клон 12	+	+	-	-
	Клон 13	+	-	-	-
	Клон 14	+	+	+	+
	Клон 15	+	+	+	+
	Клон 16	+	+	+	+
25	Клон 17	+	-	-	-
	Клон 18	+	+	+	+
	Клон 19	+	+	+	+
	Клон 20	+	-	-	-
30	Клон 21	+	+	+	+
	Клон 22	+	+	+	+
	Клон 23	+	+	+	+
	Фейерверк	-	-	-	-

Таблица 5. Органолептический анализ сладости плодов земляники садовой урожая первого года.

5	Дегустация 1		Дегустация 2		Дегустация 3	
	Тип растения	Средний балл	Тип растения	Средний балл	Тип растения	Средний балл
10	Клон 3	4,1	Клон 1	4,0	Клон 3	4,0
	Клон 12	3,9	Клон 17	3,8	Клон 6	3,8
	Клон 11	4,0	Клон 16	4,0	Клон 7	4,0
	Клон 13	4,0	Фейерверк	3,9	Клон 13	4,0
	Клон 22	4,2	Клон 21	4,0	Клон 8	3,9
	Фейерверк	4,0	Клон 12	3,9	Клон 12	3,9

Попарное сравнение сладости ягод с экспрессией тауматина с контрольными плодами показало, что во всех случаях оценки опытных образцов либо превышают контрольные (6 из 9 пар), либо равны им (3 из 9 пар). Максимальное превышение сладости плодов с экспрессией тауматина равняется 0,2 балла. Такая разница зафиксирована в четырех парах: Клон 3/Клон 12; Клон 22/Фейерверк; Клон 1/Клон 17; Клон 3/Клон 6. В двух случаях разница равнялась 0,1 балла: Клон 16/Фейерверк; Клон 21/Клон 12. Учитывая, во-первых, что для сорта Фейерверк оценка вкуса ягод выше 4 баллов не характерна, а во-вторых, максимальная оценка, используемая в селекционной практике равна 4,5, средний балл 4,2 по вкусу для Клона 22 существенно превышает оригинальные сортовые характеристики.

Урожай второго года оказался более обильным и позволил провести статистически достоверный органолептический анализ плодов. Данные приводятся в Таблице 6.

Две дегустации второго года показали достоверное отличие пяти линий с экспрессией тауматина из шести выбранных от контрольных нетрансгенных растений и линий без экспрессии тауматина, за исключением пары 3/13. Оценки дегустации второго года в среднем на 0,2 балла превышают таковые дегустации первого года. Это может быть обусловлено более благоприятными погодными условиями, способствующими накоплению сахаров.

Таблица 6. Органолептический анализ сладости плодов трансгенной земляники садовой урожая второго года и сорта Фейерверк.

	Дегустация 1		Дегустация 2	
	Тип растения	Средний балл	Тип растения	Средний балл
5	Клон 3	4±0,03	Клон 16	4,2±0,03
	Клон 12	4±0,09	Фейерверк	4,1±0,02
	Клон 1	4,5±0,03	Клон 22	4,4±0,02
	Клон 13	4,1±0,04	Фейерверк	4,2±0,12
10	Клон 8	4,3±0,09	Клон 21	4,3±0,07
	Клон 6	4±0,12	Клон 6	4,1±0,05

Пример 9. Влияние экспрессии тауматина II на устойчивость трансгенных линий земляники садовой сорта Фейерверк к *Botrytis cinerea*.

15 Основываясь на результатах ПЦР-анализа и Western-блоттинга, из полученных усовершенствованным способом трансгенных линий земляники (Schestibratov et al. 2002) были выбраны три клона с уровнем экспрессии тауматина не менее 0,2 мкг на мг суммарного белка, а именно Клон 3, Клон 7 и Клон 8, а также один клон без экспрессии (Клон 17). В качестве отрицательного

20 контроля использовались листья с растений дикого типа, линии без экспрессии тауматина (Клон 17) и трансгенной линии Клон GUS, полученной с использованием векторной конструкции pBI121.

Предварительные эксперименты показали, что на результаты анализов сильное влияние оказывают не только возраст растительной ткани и состояние

25 инокулюма *Botrytis cinerea*, а также условия, в которых инкубируются зараженные листовые диски. В роли ключевого фактора в данном случае выступает влажность камеры и фильтровальных подложек. Этот фактор оказывал влияние не столько на характер инфекции, сколько на скорость колонизации листовых дисков. Визуальная оценка развития патогена

30 проводилась через определенные промежутки времени, по этой причине влажность оказывала решающее влияние на результаты сравнения. Визуальная оценка некроза, проводимая на шестой день после инокуляции, дала следующие результаты: средняя площадь поражения составляла 27,5±12,9 % для Клона

GUS, тогда как на дисках Клона 7 некротические зоны еще не сформировались. Данные по этой и двум другим парам приводятся в Таблице 7.

Данные по степени спороношения, приведенные в Таблице 10 снимались на девятый день после инокуляции (в отличие от данных по некрозу), поскольку конидиофоры формируются на мицелии с задержкой в несколько суток после появления некротических зон на листовых дисках. Средние баллы спороношения например для пары Клон 7/Клон GUS составляли  $0,13 \pm 0,06 / 0,47 \pm 0,21$  для опытного и контрольного вариантов соответственно.

Таким образом, данные по некрозу листовых дисков подтверждают статистически достоверные различия не только внутри сравниваемых пар, но и между всеми трансгенными линиями с экспрессией тауматина с одной стороны и контрольными растениями с другой. Второй критерий, используемый нами для оценки устойчивости растений к инфекции *Botrytis cinerea*, также подтверждает достоверные различия внутри сравниваемых пар, причем на листовых дисках растений с экспрессией тауматина спороношение существенно ингибировалось.

Таблица 7. Результаты теста на устойчивость листовых дисков трансгенной земляники садовой и сорта Фейерверк к *Botrytis cinerea*.

Клон	Уровень аккумуляции тауматина, мкг/мг общего белка	Средняя площадь некроза, %	Средний балл спороношения	Индекс повышения устойчивости
Клон 7	1,5	0	$0,13 \pm 0,06$	3,6
Клон GUS	0	$27,5 \pm 12,9$	$0,47 \pm 0,21$	-
Клон 8	1	$0,7 \pm 0,3$	$0,07 \pm 0,06$	3,0
Фейерверк	0	$5,7 \pm 5,5$	$0,21 \pm 0,11$	-
Клон 3	0,2	$1 \pm 0,8$	$0,13 \pm 0,06$	2,8
Клон 17	0	$19,7 \pm 6,1$	$0,37 \pm 0,11$	-

Пример 10. Данные полевых испытаний трансгенных растений.



Полевые испытания трансгенных растений проводили на сертифицированном полигоне полевых испытаний трансгенных растений, созданном на базе карантинного питомника ВНИИСПК, г. Орел. Оценку вегетативной и генеративной активностей полевых растений проводили по

5 четырем основным критериям: количество розеток в кусту; средняя высота куста; среднее количество цветоносов; вес спелых ягод первого сбора. После двух лет роста в условиях открытого грунта большая часть трансгенных линий не проявила нежелательных фенотипических отклонений (Таблица 8). Однако

10 несколько линий (Клон 9, Клон 14, Клон 15, Клон 18, Клон 19, Клон 20, Клон 23) по основным показателям отличались от контрольных нетрансгенных растений и большинства других трансгенных растений земляники. Линии с соматоклональными изменениями визуальными выявлялись в основном по высоте куста и урожайности (весу спелых ягод первого сбора). В итоге, анализ

15 соответствия сортоотбору показал, что 16 трансгенных линий из 23 по основным показателям вегетативной и генеративной активностей соответствуют сорту Фейерверк. Таким образом, оптимизированный способ генетической трансформации земляники садовой, описанного в данном изобретении, характеризуется эффективностью получения растений без соматоклональных отклонений равной примерно 70 %.

20

Таблица 8. Результаты полевых испытаний трансгенных растений земляники садовой и сорта Фейерверк: оценка вегетативной и генеративной активностей.

25	Тип Растения	Количество розеток в кусту	Средняя высота куста, см	Среднее количество цветоносов	Вес ягод первого сбора, г	Соматоклональные изменения
	Клон 1	2,3±0,3	23,5±4,9	7,1±3,1	255±52	-
	Клон 2	3,7±1,3	22,5±1,7	5,8±2	102±15	-
	Клон 3	3,2±0,8	24,7±5,4	5±2,6	120±22	-
30	Клон 4	3,5±0,9	25,5±2,8	5±0,7	210±44	-
	Клон 5	3,4±0,7	27±8,9	5,9±2,3	285±35	-
	Клон 6	3,9±1,6	22,2±0,9	5,3±1,5	289±56	-
	Клон 7	3,5±1	26,2±2,8	6,5±1,8	209±36	-

Таблица 8 (продолжение)

Тип Растения	Количество розеток в кусту	Средняя высота куста, см	Среднее количество цветоносов	Вес ягод первого сбора, г	Соматологические изменения
Клон 8	3,8±1,1	28,5±12	5,8±0,4	159±41	-
Клон 9	3,3±1,3	19,8±1,9	2,3±1,7	43±13	+
Клон 10	3,5±0,8	21,5±3,5	4,9±0,5	250±23	-
Клон 11	3,3±0,3	21±3	4,4±1,7	198±17	-
Клон 12	3,5±0,7	24,5±1,1	4,9±2,4	167±18	-
Клон 13	3,2±1,6	22,3±2,3	3,3±1,3	198±23	-
Клон 14	2,3±0,9	6,9±3,1	1,7±1,2	0	+
Клон 15	2,5±0,7	14,3±3,2	1,8±0,3	0	+
Клон 16	3,2±1	22,9±4,2	3,2±1,1	302±98	-
Клон 17	3,7±0,3	25,1±1,9	4,1±1	277±63	-
Клон 18	2,4±1	10,1±2,5	2,7±1,5	78±14	+
Клон 19	2,2±0,3	15,3±1,1	2,1±0,4	35±15	+
Клон 20	3,6±0,9	12,7±0,9	1,2±1,2	0	+
Клон 21	3,5±0,5	24,8±1,3	6,1±1,4	319±78	-
Клон 22	3,7±1,5	24,5±2	4,4±2,1	288±58	-
Клон 23	2,2±0,8	11,3±2,5	1,5±0,5	83±26	+
Фейерверк	3,2±0,7	24,2±2,9	4,8±1	266±35	-

Пример 11. Влияние по-стадийной кокультивации с *Agrobacterium tumefaciens* на транзистентную GUS-экспрессию в тканях эксплантов яблони.

При генетической трансформации яблони сорта Мельба с использованием усовершенствованного протокола на стадии транзистентной GUS-экспрессии наблюдалась более высокая ее частота в группах А-3 и А-4 варианта А (относительно контрольного варианта Б). Результаты анализа приведены на Фиг. 7. Также как и в случае с земляникой садовой, частота GUS-экспрессии оценивалась в пересчете на число срезов, подвергшихся взаимодействию с агробактериями, а не число эксплантов. Помимо увеличения частоты GUS-экспрессии, наблюдалось также изменение в интенсивности GUS-активности. В

варианте А параллельно с ростом частоты имело место увеличение силы GUS-окрашивания эксплантов после инкубации в растворе X-Gluc.

Пример 12. Данные ПЦР и Western-blotting анализов трансгенных растений яблони, полученных с помощью бинарного вектора pBITthau35.

5 Усовершенствованным методом генетической трансформации было получено 2 независимые трансгенные линии яблони. Полученные регенеранты укоренялись на среде с 25 мг/л канамицина. ПЦР-анализ образцов тотальной ДНК на предмет присутствия фрагмента в 742 п.о. гена *nptII* и фрагмента гена *thauII* размером 878 п.о. показал, что все линии содержат геномные вставки  
10 двух последовательностей (Таблица 9). Иммунодетекция белка в вегетативных тканях (листьях) растений *in vitro* и *in vivo* показала, что экспрессирующая кассета функционирует и белок синтезируется в обеих линиях (Таблица 9).

15 Таблица 9. Результаты ПЦР и Western-блоттинг анализов трансгенных линий яблони сорта Мельба.

20 Тип растения	ПЦР анализ на ген <i>npt II</i>	ПЦР анализ на ген <i>thau II</i>	Иммуно-детекция тауматина в листьях <i>in vitro</i>	Иммуно-детекция тауматина в листьях <i>in vivo</i>
Клон М-I-1	+	+	+	+
Клон М-I-2	+	+	+	+
Мельба	-	-	-	-

25 Пример 13. Данные ПЦР анализа трансгенных растений сорта Seleka, полученных с помощью бинарного вектора pBITthau35.

Используя усовершенствованный способ генетической трансформации было получено 15 независимых трансгенных линий. Полученные регенеранты укоренялись на среде с 25 мг/л канамицина. ПЦР-анализ образцов тотальной  
30 ДНК на предмет присутствия фрагмента в 742 п.о. гена *nptII* показал, что все линии содержат геномную вставку изучаемой последовательности. Результаты ПЦР-анализа представлены в Таблице 10.

Анализ тех же образцов тотальной ДНК с использованием пары праймеров к последовательности гена *thauII* выявил, что не все *nptII*-положительные линии  
35 содержат вставку гена тауматина II. ПЦР-анализ показал, что

амплифицируемый фрагмент размером 878 п.о. присутствовал в 13 из 15 анализируемых образцов. Трансгенные линии Клон S4, Клон S9, несмотря на присутствие функционирующей вставки гена *nptII* не содержали последовательность тауматина II. Результаты ПЦР-анализа представлены в

5 Таблице 10.

Пример 14. Данные Western-blot анализа трансгенных растений сорта Seleкта, полученных с помощью бинарного вектора pBIT<sub>thau35</sub>.

Иммунодетекция белка в вегетативных тканях (листьях) показала, что экспрессирующая кассета функционирует и белок синтезируется во всех (13)

10 *thauII*-положительных независимых линий. В листьях нетрансгенных растений, также как и в линиях Клон S4, Клон S9 без вставки *35S-thaumatin-3'nos* присутствие тауматина II не обнаружено. Результаты проведенного Western-блоттинг анализа в листьях трансгенных линий приводятся в Таблице 10.

Таблица 10. Результаты ПЦР и Western-блоттинг анализов трансгенных

15 линий земляники садовой (клоны S1-S15) и сорта Seleкта.

Тип растения	ПЦР анализ на ген <i>npt II</i>	ПЦР анализ на ген <i>thau II</i>	Иммунодетекция тауматина в листьях	Иммунодетекция тауматина в плодах
Клон S1	+	+	+	+
Клон S2	+	+	+	+
Клон S3	+	+	+	+
Клон S4	+	-	-	-
Клон S5	+	+	+	+
Клон S6	+	+	+	+
Клон S7	+	+	+	+
Клон S8	+	+	+	+
Клон S9	+	-	-	-
Клон S10	+	+	+	+
Клон S11	+	+	+	+
Клон S12	+	+	+	+
Клон S13	+	+	+	+
Клон S14	+	+	+	+
Клон S15	+	+	+	+
Seleкта	-	-	-	-

Иммунологический анализ экспрессии тауматина в плодах трансгенных линий также подтвердил присутствие белка. Данные коррелируют с экспрессией тауматина в листьях.

- 5 Таблица 11. Результаты полевых испытаний трансгенных растений земляники садовой (линии S1-S15) и сорта Selekt: оценка вегетативной и генеративной активностей.

Тип Растения	Средняя высота куста, см	Среднее количество цветоносов	Средний вес ягоды, г	Соматоклональные изменения
Клон S1	21,5±2,3	3,3±1,2	11,4±4,6	-
Клон S2	18±1,9	3±1,3	13,2±5,3	-
Клон S3	21±4	2,7±1,6	14±7,3	-
Клон S4	23,5±2,8	2,3±1,2	11,8±6,6	-
Клон S5	21±4,9	2±0,6	8±2,3	-
Клон S6	20,6±1,9	1,5±1	14,1±6,5	-
Клон S7	22,2±2,8	2,3±0,8	11,1±6,8	-
Клон S8	18,5±2	2,8±0,8	10,2±6	-
Клон S9	14,8±1	3,2±2	9,4±2,1	+
Клон S10	11,5±2,5	0,7±0,5	3±1,4	+
Клон S11	20±3	0,3±0,1	13,8±8,4	+
Клон S12	21,5±2,1	1,5±0,8	10,1±3,3	-
Клон S13	12,3±1,3	3,7±2	9,8±4,3	+
Клон S14	10,7±3	2,2±1	8,2±4,7	+
Клон S15	19,4±4,2	1,7±1	13,3±4,9	-
Selekt	20,2±1,8	2±0,8	10,4±3,8	-

Пример 15. Данные полевых испытаний трансгенных растений сорта Seleкта.

Оценку вегетативной и генеративной активностей полевых растений проводили по четырем основным критериям: средняя высота куста; среднее количество цветоносов; средний вес ягоды. Анализ соответствия сорто-  
5 типу показал, что 10 трансгенных линий из 15 по основным показателям вегетативной и генеративной активностей соответствуют сорту Seleкта. Линии с соматоклональными изменениями визуально выявлялись в основном по высоте куста, количеству цветоносов, среднему весу ягод (Таблица 11). Таким образом, оптимизированный способ генетической трансформации земляники садовой,  
10 описанного в данном изобретении, характеризуется эффективностью получения растений без соматоклональных отклонений равной 66,7 %, что хорошо согласуется с данными по сорту Фейерверк.

Пример 16. Данные органолептического анализа плодов трансгенных линий земляники садовой сорта Seleкта.

Попарное сравнение сладости ягод с экспрессией тауматина с контрольными плодами продемонстрировало, что показатели опытных образцов либо превышают контрольные, либо равны им. Дегустация показала  
20 достоверное усиление сладости в двух линиях (Клоны S2 и S3) из пяти с экспрессией тауматина, выбранных для анализа (Таблица 12). Максимальное превышение сладости плодов с экспрессией тауматина равняется 0,3 балла.

Таблица 12. Органолептический анализ сладости плодов трансгенных линий земляники садовой и сорта Seleкта.

25

30

Дегустация 1		Дегустация 2	
Тип растения	Средний балл	Тип растения	Средний балл
Клон S1	4±0,03	Клон S4	4±0,07
Клон S2	4,3±0,05	Клон S6	4±0,13
Клон S3	4,2±0,05	Клон S10	4±0,08
Seleкта	4±0,07	Seleкта	4±0,14

### Промышленная применимость

Усовершенствованный способ подготовки, инокуляции и кокультивации эксплантов повысил все показатели, характеризующие эффективность способа генетической трансформации. Данный способ характеризуется низкой частотой некроза эксплантов, повышенной частотой транзиемной экспрессии, повышенной частотой формирования трансгенных тканей, повышенной частотой регенерации трансгенных побегов, более высокой долей прямых трансформантов, низкой частотой соматоклональных изменений.

Способ генетической трансформации, описываемый в данном изобретении, позволил получить достаточное число трансгенных линий земляники садовой сортов Фейерверк и Selekt, и получить подтверждение эффективности способа при генетической трансформации яблони сорта Мельба. В процессе лабораторных и полевых испытаний сортов Фейерверк и Selekt удалось отобрать ряд линий с ярко выраженными улучшенными агрономическими характеристиками (улучшенный вкус ягод, повышенная устойчивость к серой гнили). Более того, эти линии не обладали нежелательными фенотипическими отклонениями, которые часто возникают при регенерации *in vitro* земляники садовой через каллусную стадию.

Усовершенствованный способ трансформации предоставляет широкую возможность выбора генетического материала для создания устойчивых к фитопатогенам растений, растений ориентированных на синтез белков используемых в фармакологии.

## Литература

- Ревенкова Е.В. и др.(1994) Development of a new vector system based on *Agrobacterium tumefaciens* A281 strain. Разработка новой векторной системы на базе штамма *Agrobacterium tumefaciens* A281: [Докл.] Тез. ежегод. конф. направления "Ген. и клеточ. инж." Гос. науч.-техн. прогр. России "Нов. методы биотехн.", [Москва, 1994]
- Abad L. R. et al. (1996) Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science* 118: 11-23.
- Boxus P.H. (1974) The production of strawberry plants by *in vitro* propagation. *J. Hort. Sci.* 49: 209-210.
- De Mesa MC. et al. (2000) *Agrobacterium* cells as microprojectile coating stable transformation rates in strawberry. *Aust.J.Plant Physiol.* 27: 1093-1100.
- Dier et al. (2001) Methods for strawberry transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. USA patent N 6274791.
- Dolgov S.V. et al. (1999). Expression of thaumatinII gene in horticultural crops. In: *Developments in plant breeding. Vol. 8 "Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance"* ed. S. Mugnozza, E. Porceddu and M. Pagnotta. Kluwer Ac. Publ. Dordrecht,, Boston, London, pp 165-172.
- du Plessis H.J. et al. (1997). Efficient genetic transformation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Cultivar Selekt. *Acta Hort. (ISHS)* 447:289-294
- Edens L. et al. (1982) Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *E. coli*. *Gene*.18(1):1-12.
- Humara J.M. et al. (1999) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer *Plant Cell Reports* 19 : 51-58
- James DJ. et al. (1990) *Agrobacterium*-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors. *Plant Sci* 69: 79-94.
- Jefferson R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5: 387-405.
- Linthorst HJM et al. (1989) Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* 1: 285-291.



- Maniatis T. et al. (1982) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press, New York.
- Marcotrigiano M. et al. (1987) Histogenic instability in tissue culture proliferated strawberry plants. *J. Amer.Soc.Hort.Sci.* 112: 583-587.
- 5 Mathews H. et al. Plant genetic transformation methods and transgenic plants. US patent 5750870. (May 12, 1998).
- Morozova T. (2002). Genetic stability of pure lines of *Fragaria vesca*. in micropropagation and long-term storage *in vitro*. *Acta Hort. (ISHS)* 567:85-88
- Mussinan CJ et al. (1975) Organic acid from fresh California strawberries. *J*  
10 *Agric Food Chem* 23: 482-482.
- Murashige T. et al. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Nehra NS et al. (1990b) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep* 9: 293-298.
- 15 Olhoft P.M. et al. (2001) The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20:731-737
- Peng G. et al. (1991) Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian journal of plant pathology* 13: 247-257.
- 20 Perl A et al. (1996) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nat Biotechnol* May;14(5):624-8.
- Roberts W. K. et al. (1990) Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1771-1778. Linthorst HJM  
25 (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit Rev Plant Sci* 10: 123-150.
- Rogers S. et al. (1995) Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. // Gelvin S., Schiperoort R. (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London. Section 7-1
- Schestibratov K et al. (2001) Plant regeneration from excised cotyledons of *pinus radiata*. / in Abstracts of 43rd ETCS Congress, Granada, Spain, September 30-  
30 October 3, 2001.
- Schestibratov K.A. et al. (2002) Molecular breeding of strawberry cv. Firework for enhanced disease resistance and taste improvement by introduction of *thauII* and

*rs-afp3* genes./ in Abstracts of The Agricultural Biotechnology International Conference, Saskatoon, Canada, September 15-18, 2002.

Stintzi A et al. (1993) Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. *Biochemie* 75: 687-706.

5 Sutter, E. et al. (1997) Direct regeneration of strawberry (*Fragaria x ananassa* *duch.*) from leaf disks. *Acta Hort.* (ISHS) 447:243-246

Szwacka M et al. (2002) Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24 (2) pp. 173-185, 2002.

10 Trinh H. et al. (2001) Regeneration and transformation methods. / EMBO Practical Course on the New Plant Model System *Medicago truncatula* Gif-sur-Yvette France (november 19 - december 1st 2001).

Sambrook, J et al. (1989) *Molecular cloning: a laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

15 Hansen G. Plant transformation methods US Patent 6,162,965 (December 19, 2000)

Baker, B. J. et al. Non-pathogen induced systemic acquired resistance (SAR) in plants. US Patent Appl.20020004944 (January 10, 2002)

20 Ryals J.A. et al. Method of protecting plants from oomycete pathogens US Patent 5,856,154 (January 5, 1999).

Stuart D.A. et al. Enhanced somatic embryogenesis using maltose US Patent 4,801,545 (January 31, 1989)

Verrips C.T. et al. DNA sequences encoding the various allelic forms of mature thaumatin, and cloning vehicles, etc. US Patent 4,891,316 (January 2, 1990).

## Формула

1. Способ получения трансгенного растения, включающий обработку ткани растения *Agrobacterium tumefaciens* который содержит, по крайней мере, один вектор, в состав которого входит, по крайней мере, один, представляющий  
5 интерес ген отличающийся тем, что на этапе трансформации используют постадийную кокультивацию эксплантов которая содержит:

i) стадию выбора одного или более листовых сегментов для подготовки эксплантов;

ii) подготовку листовых дисков путем отделения от каждого листового диска  
10 сегмента и последующей инокуляции и кокультивации листовых дисков с агробактериями;

iii) стадию удаления с листовых дисков избытка агробактерий и последующего отделения со стороны первого среза первой партии эксплантов;

iv) стадию переноса эксплантов на среду селекции и регенерации;

v) подготовку последующих партий эксплантов в соответствии с пунктами  
15 iii) и iv) до формирования последней партии эксплантов из выбранных листовых дисков;

причем, подготовка каждой из последующих партий эксплантов выполняется после временного интервала необходимого для трансформации  
20 растительных клеток и формирования в листовых дисках индуцируемой резистентности к абиотическим и биотическим стрессам и снижения частоты соматональных изменений в трансгенном растении.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что вектор содержит генетический материал кодирующий, по крайней мере, один целевой белок.

25 3. Способ по п.1, отличающийся тем, что вектор содержит генетический материал кодирующий, по крайней мере, один белок который содействует снижению некроза на стадии трансформации.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что вектор содержит генетический материал, кодирующий, по крайней мере, один белок, который повышает  
30 устойчивость растения к фитопатогенам, и который выбирают из групп: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что вектор содержит генетический материал, кодирующий комбинацию белков по пунктам 2,3 или 2,4 или 3,4 или 2-4.

6. Способ по п.4, отличающийся тем, что вектор содержит генетический материал, кодирующий тауматин, относящийся к группе PR-5.

7. Способ по п.4, отличающийся тем, что генетический материал кодирует устойчивость к грибам, выбираемым из группы, состоящей из *Phytophthora fragariae*, *Verticillium alboatrum*, *Mycosphaerella fragariae*, *Diplocarpon earliana*, *Dendrophoma obscurans*, *Botrytis cinerea*, *Sphaerotheca humuli*.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что для трансформации выбираются растения из группы двудольных.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что для трансформации выбирают двудольное растение из группы, состоящей из: яблони, груши, земляники садовой, моркови и томатов.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что для трансформации выбирают растение земляники садовой выбираемое из группы сортов: Seleкта, Chambly, Oka, Joliette, Yamaska, L'Acadie, L'Authentique Orleans, Rosalyne, Roseberry, Saint-Pierre, Donna, Enzed Levin, Enzed Lincoln, Vilanova, Durval, Redcrest, Bountiful, Redgem, Pelican, Primtime, Mohawk, Latestar, Winoma, Фейерверк.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество шагов в постадийной кокультивации эксплантов выбирают в диапазоне от 2 до 5.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество шагов в постадийной кокультивации эксплантов выбирают в диапазоне от 3 до 4.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что подготовку каждой из последующих партий эксплантов выполняют после временного интервала от 1 до 5 суток.

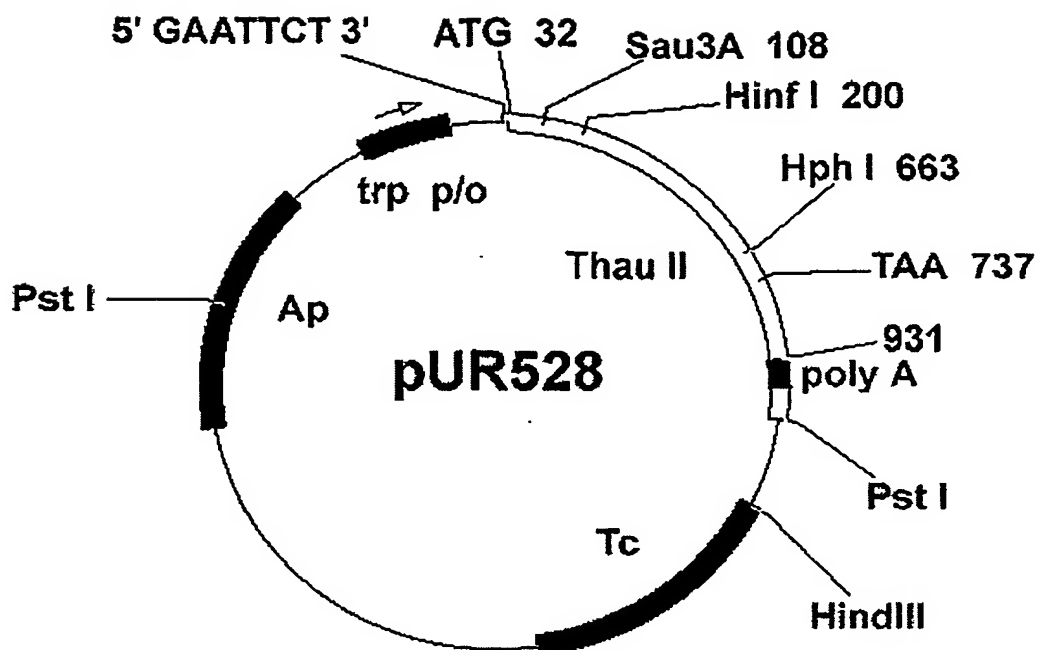
15. Способ по п.1, отличающийся тем, что подготовку каждой из последующих партий эксплантов выполняют после временного интервала 3 суток.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что с целью повышения индуцируемой резистентности к абиотическим и биотическим стрессам из состава среды кокультивации исключают регуляторы роста.

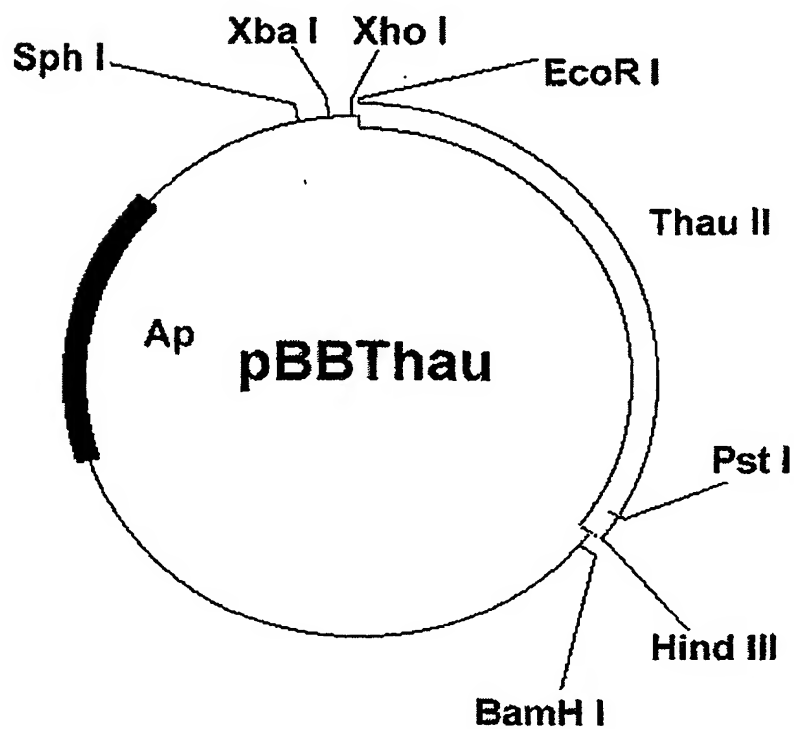
17. Способ по п.1, отличающийся тем, что в состав среды селекции и регенерации входят ТДЗ, ИМК и канамицин.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что концентрацию ТДЗ выбирают от 1 до 10 мг/л.
19. Способ по п.17, отличающийся тем, что концентрация ТДЗ составляет 5 мг/л.
- 5 20. Способ по п.17, отличающийся тем, что концентрацию ИМК выбирают от 0 до 2 мг/л.
21. Способ по п.17, отличающийся тем, что концентрация ИМК составляет 0,3 мг/л.
22. Способ по п.17, отличающийся тем, что концентрацию канамицина  
10 выбирают от 10 до 100 мг/л.
23. Способ по п.17, отличающийся тем, что концентрация канамицина составляет 50 мг/л.
24. Способ по п.1 отличающийся тем, что соотношение длины среза и площади экспланта и от 0,1 мм / мм<sup>2</sup> до 2 мм / мм<sup>2</sup>.
- 15 25. Способ по п.1 отличающийся тем, что соотношение длины среза и площади экспланта составляет 0,5 мм / мм<sup>2</sup>.

1/5

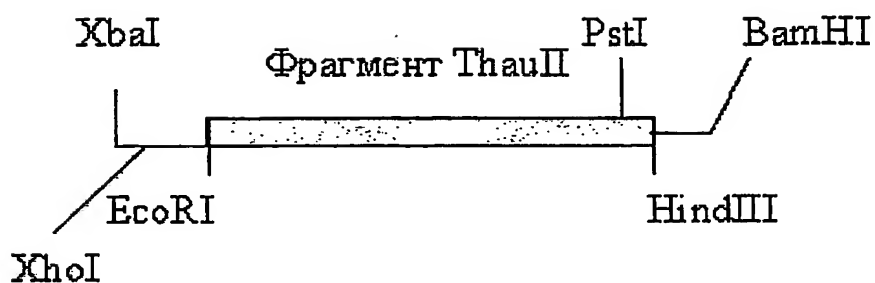


Фиг 1 А

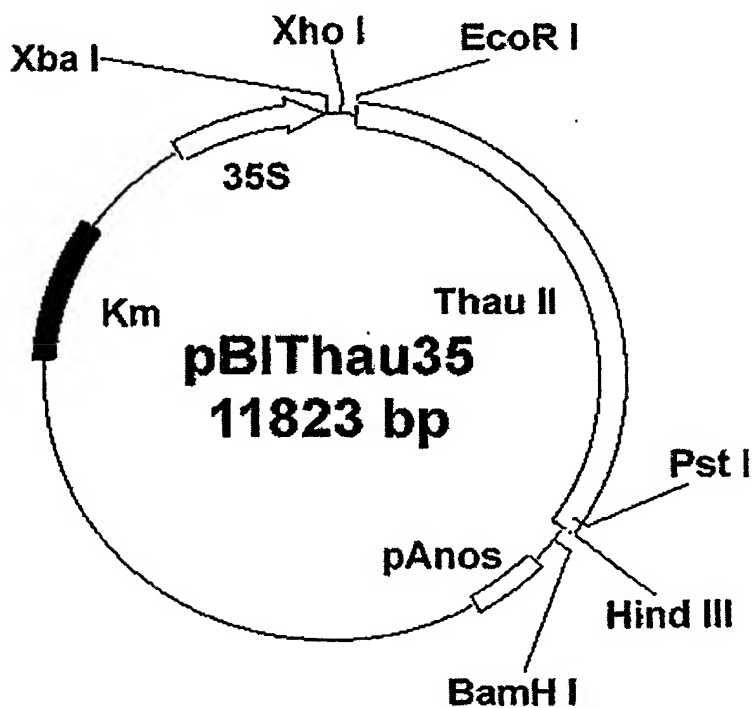


Фиг 1 Б.

2/5

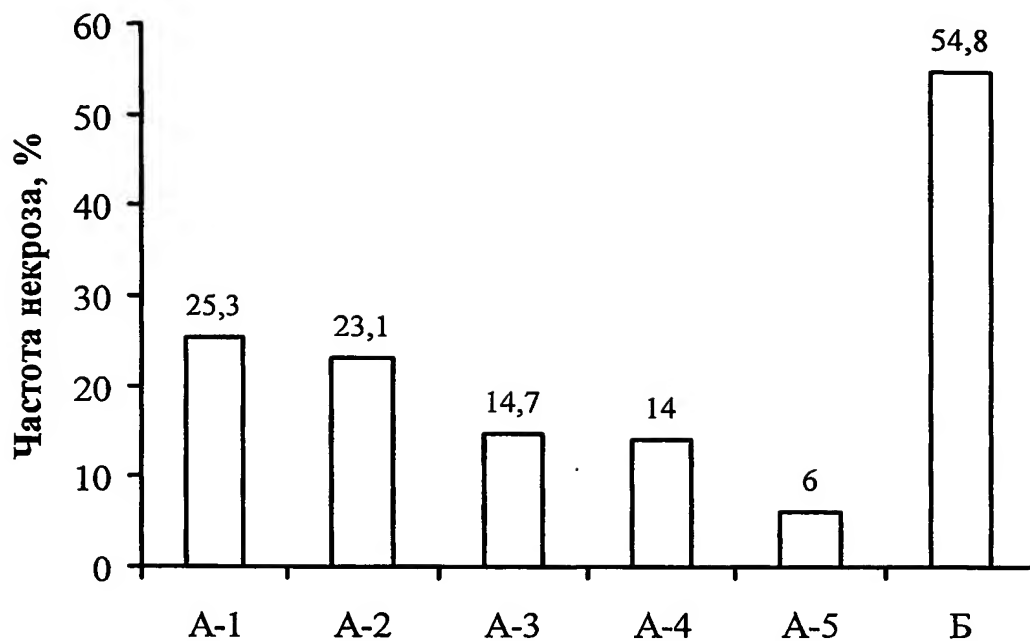


Фиг 1 В

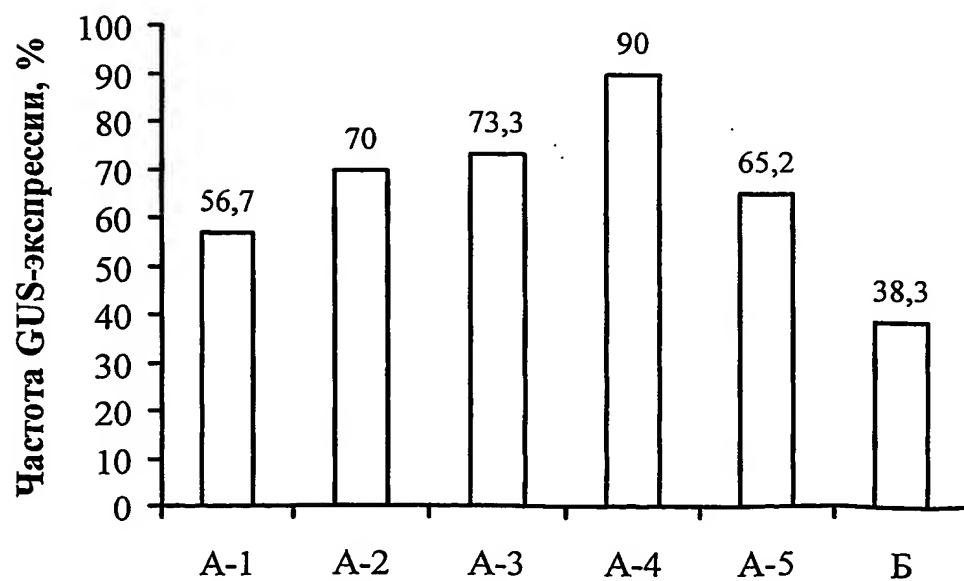


Фиг 2

3/5



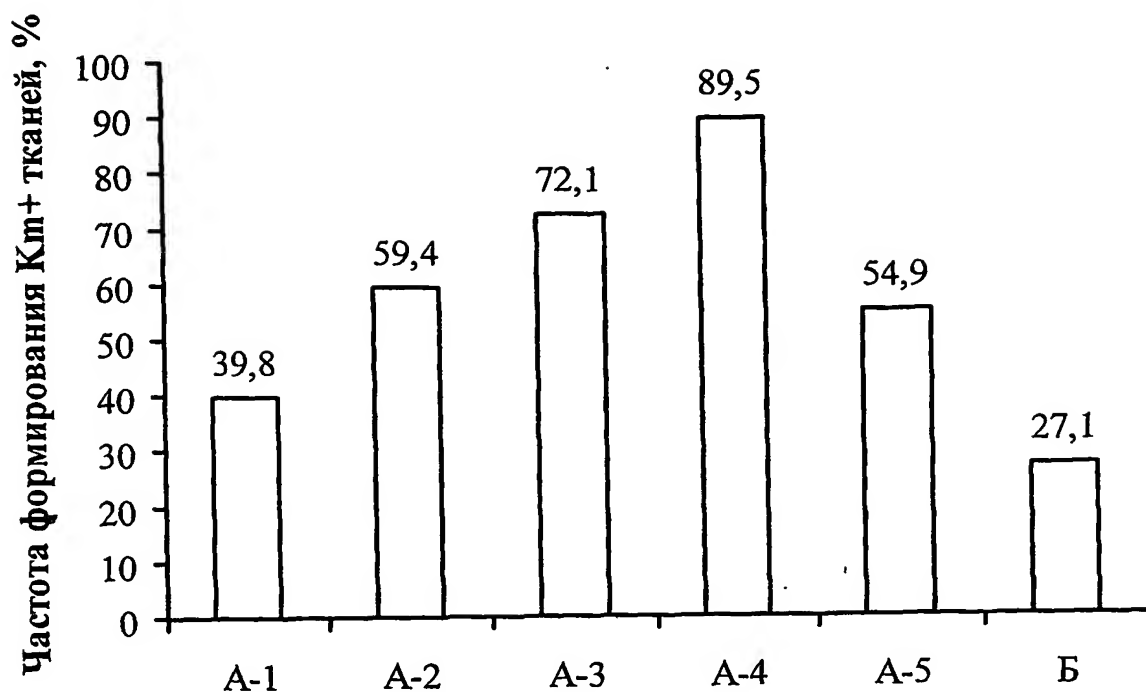
Фиг 3



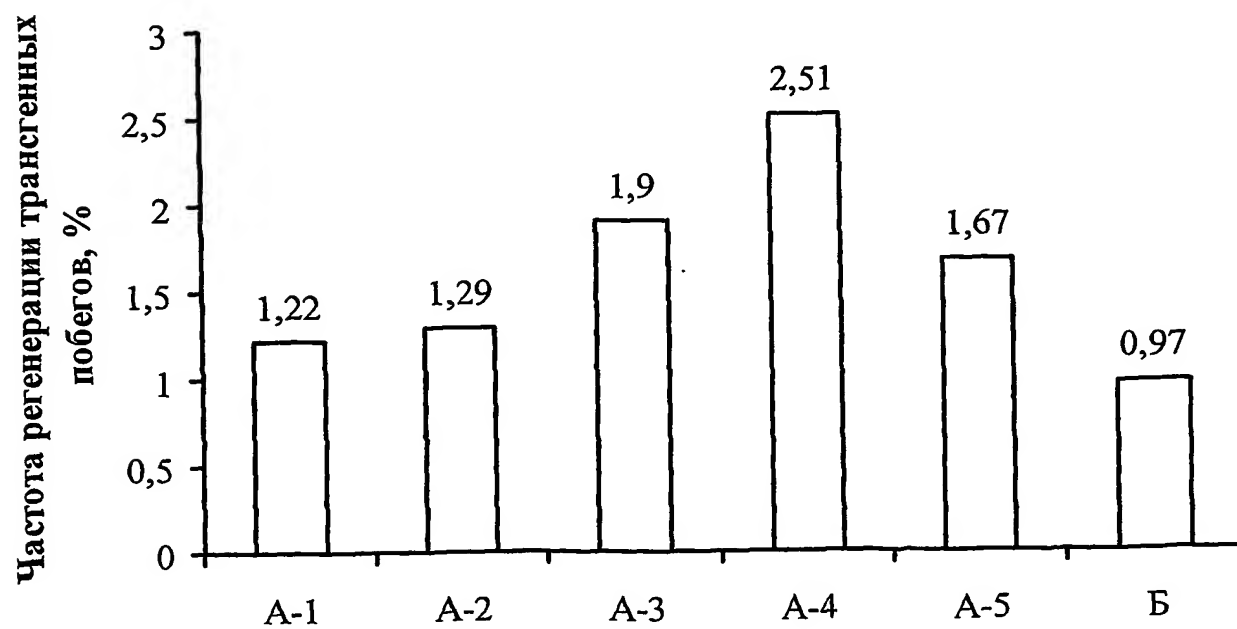
Фиг 4



4/5

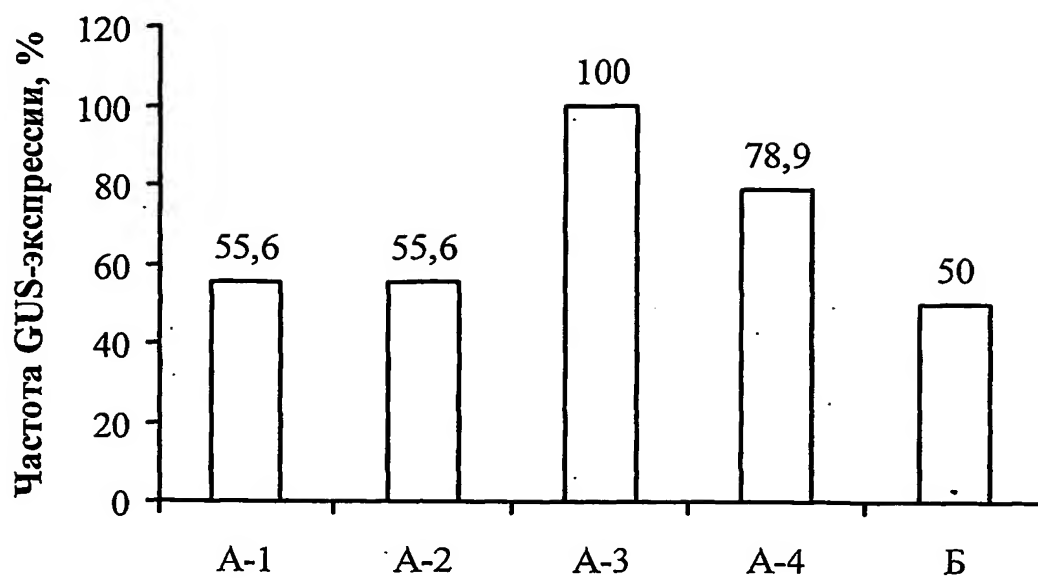


Фиг 5



Фиг 6

5/5



Фиг 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/RU 2003/000439

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/29,15/52,15/82, A01H 1/06,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC MTK-7:

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)MTK-7:

C12N 15/29,15/52,15/82, A01H 5/00,1/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RU 97109836 A (NIPPON PAPER INDUSTRIES LTD.) 10.05.1999, the abstract	1-25
A	EP 0307841 (GEN HOSPITAL CORP) 22.03.1989, the claims	1-25
A	Under editorship. Dzh. Dreipera et al., Gennaya inzhenernaya rasteny, Laboratornoe rukovodstvo, Moscow, "Mir", 1991, pages 119-130	1-25
A	N. S. NEHRA "Genetic transformation of strawberry by Agrobacterium tumefaciens using a leaf disk regeneration system", Plant Cell Rep., (1990) 9, 6, 293-98, the abstract	1-25
A	D. J. JAMES "Agrobacterium-mediated transformation of the cultivated strawberry (Fragaria x ananassa Duch.) using disarmed binary vectors". Plant Scientist (1990) 69, 1, 79-94. the abstract	1-25

☐

Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**04 February 2004 (04.02.2004)**

Date of mailing of the international search report

**19 February 2004 (19.02.2004)**

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №  
PCT/RU 2003/000439

## А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 15/29,15/52,15/82, A01H 1/06,

Согласно международной патентной классификации (МПК-7)

## В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7:

C12N 15/29,15/52,15/82, A01H 5/00,1/06

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):

## С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 97109836 A (НИППОН ПЕЙПЕР ИНДАСТРИЗ КО., ЛТД.) 10.05.1999, реферат	1-25
A	EP 0307841 (GEN HOSPITAL CORP) 22.03.1989, формула	1-25
A	Под ред. Дж. Дрейпера и др., Генная инженерия растений, Лабораторное руководство, Москва, "Мир", 1991, с. 119-130	1-25
A	N. S. NEHRA "Genetic transformation of strawberry by Agrobacterium tumefaciens using a leaf disk regeneration system", Plant Cell Rep., (1990) 9, 6, 293-98, реферат	1-25
A	D. J. JAMES "Agrobacterium-mediated transformation of the cultivated strawberry (Fragaria x ananassa Duch.) using disarmed binary vectors". Plant Scientist (1990) 69, 1, 79-94. Реферат	1-25

Последующие документы указаны в продолжении графы С.

Данные о патентах-аналогах указаны в приложении

\* Особые категории ссылочных документов:

A документ, определяющий общий уровень техники

E более ранний документ, но опубликованный на дату  
международной подачи или после нее

O документ, относящийся к устному раскрытию, экспони-  
рованию и т.д.

P документ, опубликованный до даты международной по-  
дачи, но после даты испрашиваемого приоритета  
и т.д.

T более поздний документ, опубликованный после даты  
приоритета и приведенный для понимания изобретения

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету  
поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

Y документ, порочащий изобретательский уровень в соче-  
тании с одним или несколькими документами той же  
категории

& документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного  
поиска: 04 февраля 2004 (04.02.2004)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске:  
19 февраля 2004 (19.02.2004)

Наименование и адрес Международного поискового органа  
Федеральный институт промышленной  
собственности

РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб.,  
30,1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:

О. Сорокин

Телефон № 240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(июль 1998)